

582

66-1

FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA



PURIFICACION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y  
SU IDENTIFICACION CON LA LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA  
EN ESCHERICHIA COLI.

*Juzgada el 5. Octubre-1982*

*Calificación: Tesina - Sobresaliente*

*Grado Sobresaliente*

LAURA BALDOMA LLAVINES

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701740969

Memoria presentada por Dña. Laura Baldomá Llavínés para optar al grado de Licenciado en Farmacia.

Ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección del Profesor Dr. Juan Aguilar Piera.

Barcelona, septiembre de 1982.

a Joan i Xavier.

## AGRADECIMIENTOS.

Al terminar este trabajo, quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas, que de una u otra forma, lo han hecho posible.

Al Dr. Joan Aguilar Piera, Director del presente trabajo, por la confianza y dedicación que en todo momento me ha prestado.

Al Dr. Fausto García Hegardt, Catedrático del Departamento de Bioquímica, por haber hecho posible la realización de este estudio.

A Estrella Caballero, por su constante dedicación y ayuda a lo largo de la realización de este trabajo, y a los demás compañeros de laboratorio: Joaquim Ros, por sus consejos y guía sobretodo en relación con las técnicas electroforéticas; y Pepita Badia, por su colaboración en la parte experimental.

A los restantes miembros del Departamento por la colaboración que en todo momento me han prestado.



## ABREVIATURAS.

DEAE	dietilaminoetil
EDTA	etilenodiamino tetracetato
etg	utilización de etilenglicol
x g.	gravedades
GlaDH	glicolaldehido deshidrogenasa
Km	constante de Michaelis aparente
LalDH	lactaldehido deshidrogenasa
NAD	Nicotinamido adenina dinucleótido
NADH	" " " reducido
NADP	" " " fosfato
NADPH	" " " " "
	reducido.
NBT	azul de nitrotetrazolio
nm	nanometros
mA	miliamperios
PEG	polietilenglicol
PMS	fenacina metasulfato
prd	utilización de propanodiol
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	dodecil-sulfato sódico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
Vmax	velocidad máxima.

## INDICE .

	página
1. INTRODUCCION	
1.1. METABOLISMO DEL ETILENGLICOL EN BACTERIAS.....	1
1.1.1. Importancia de la biodegradación del etilenglicol.....	1
1.1.2. Microorganismos que metabolizan etilenglicol .....	2
1.1.3. Vias metabólicas del etilenglicol en bacterias .....	4
1.2. METABOLISMO DEL ETILENGLICOL EN <u>ESCHERICHIA</u> <u>COLI</u> .....	8
1.2.1. Mutantes de <u>Escherichia coli</u> capaces de utilizar etilenglicol; cepa EG3 ....	8
1.2.2. Via metabólica del etilenglicol en mutantes de <u>Escherichia coli</u> .....	9
1.3. GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA .....	13
1.3.1. Actividades glicolaldehido deshidroge- nasa descritas en la literatura.....	13
1.3.2. Caracterización parcial de algunas propiedades del enzima responsable de la actividad glicolaldehido des- hidrogenasa en mutantes etilenglicol positivos .....	14
1.4. OTRAS ALDEHIDO DESHIDROGENASAS .....	18
1.4.1. Consideraciones generales .....	18
1.4.2. Descripción de algunas aldehido deshidrogenasas .....	21

1.5.	LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA DE <u>ESCHERICHIA</u>	
	<u>COLI</u> .....	27
1.5,1.	Metabolismo del L-1,2-propanodiol en mutantes de <u>Escherichia coli</u> .....	27
1.5,2.	Relación de la vía de utilización del L-1,2-propanodiol con el metabolismo de la L-fucosa .....	29
1.6.	POSIBLE IDENTIDAD ENTRE GLICOLALDEHIDO DESHI- DROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA .....	33
2.	MATERIALES Y METODOS.	
2.1.	CEPAS BACTERIANAS.....	36
2.2.	CONSERVACION Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS .....	37
2.3.	OBTENCION DE EXTRACTOS CELULARES .....	39
2.4.	TECNICAS DETERMINATIVAS .....	40
2.4,1.	Determinación de proteína .....	40
2.4.1.1.	Determinación de proteína por el método del Biuret .....	40
2.4.1.2.	Determinación de proteína por el método de Lowry .....	40
2.4.2.	Determinación de actividades enzimáticas.	41
2.4.2.1.	Determinación de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa...	42
2.4.2.2.	Determinación de la actividad lactaldehido deshidrogenasa .....	42
2.5.	TECNICAS ELECTROFORETICAS.....	44
2.5.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.....	44

2.5.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS .....	46
2.5.3.	Revelado de los geles por proteina .....	46
2.5.4.	Revelado de los geles por actividad enzimática .....	47
2.6.	TECNICAS CROMATOGRAFICAS.....	48
2.7.	PREPARACION DEL LACTALDEHIDO .....	49
2.7.1.	Sintesis del lactaldehido .....	49
2.7.2.	Purificación del lactaldehido purificado...	50
2.7.3.	Valoración del lactaldehido .....	51
2.7.3.1.	Valoración del lactaldehido por iodimetria.....	52
2.7.3.2.	Valoración espectrofotométrica del lactaldehido .....	52
2.7.4.	Desdimerización del lactaldehido.....	53
2.8.	TRATAMIENTO DE MATERIALES Y PRODUCTOS .....	54
2.8.1.	Tratamiento de membranas de diálisis.....	54
2.8.2.	Regeneración de matrices cromatográficas...	54
2.9.	PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.....	56
3.	RESULTADOS.	
3.1.	EXTRACTO CELULAR Y SU ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	59
3.2.	PURIFICACION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA..	63
3.2.1.	Precipitación fraccionada con sulfato amónico.....	63
3.2.2.	Cromatografias de intercambio iónico.....	64
3.2.3.	Cromatografias de afinidad.....	68
3.2.3.1.	Cromatografia de afinidad en Afi-gel blue .....	68
3.2.3.2.	Cromatografia de afinidad en AGNAD	70

3.2.4. Cromatografía de gel filtración en ultrogel ACA-34,.....	74
3.2.5. Criterios de homogeneidad.....	80
3.2.6. Estabilidad ,.....	81
3.3. ACTIVIDAD DE LA PREPARACION ENZIMATICA PU- RIFICADA SOBRE OTROS SUSTRATOS.....	85
3.3.1. Actividad del enzima glicolaldehido deshidrogenasa sobre otros aldehidos..	85
3.3.2. Cálculo de los valores de Km y Vmax para el glicolaldehido, el L-lactal- dehido y el L-gliceraldehido.....	86
3.4. ALGUNOS CRITERIOS SOBRE LA IDENTIDAD ENTRE LA GLICOLALDEHIDO Y LA LACTALDEHIDO DESHIDROGE- NASA.....	92
3.4.1. Copurificación de las actividades glicolaldehido deshidrogenasa y lactal- dehido deshidrogenasa en una cromatogra- fia de intercambio iónico en DEAE-se- phadex .....	92
3.4.2. Copurificación de las actividades glicol- aldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa en todo el proceso de purificación diseñado para el enzima glicolaldehido deshidrogenasa .....	93
3.4.3. Estudio electroforético de las acti- vidades enzimáticas descritas en el apartado anterior .....	96

4.	DISCUSION.	
4.1.	INTERES DE LOS ENZIMAS GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA EN LA EVOLUCION DE VIAS METABOLICAS DE GLICOLES.....	100
4.2.	PURIFICACION DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.....	104
4.3.	ACTIVIDAD DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA PURIFICADA SOBRE OTROS ALDEHIDOS.....	113
4.4.	EVIDENCIAS DE QUE AMBAS ACTIVIDADES SON FUNCION DE LA MISMA PROTEINA.....	115
5.	CONCLUSIONES	124
6.	BIBLIOGRAFIA	128

# 1. INTRODUCCION.

## 1.1. METABOLISMO DEL ETILENGLICOL EN BACTERIAS.

### 1.1.1. IMPORTANCIA DE LA BIODEGRADACION DEL ETILENGLICOL.

El etilenglicol ( $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) pertenece a un grupo de compuestos orgánicos denominados "Glicoles" que se caracterizan por estar formados de unidades de óxido de etileno unidas mediante enlaces tipo eter y con grupos hidroxilo en los carbonos terminales.

Son volátiles, altamente higroscópicos, sin color, ni olor y muy solubles en agua. Por todo ello, son ampliamente usados hoy en día. El mayor consumo de etilenglicol es para la obtención de anticongelantes para automóviles, pero también se usa en la fabricación de humectantes, lubricantes, líquidos de freno, etc. Además, es uno de los productos formados por la biodegradación de varios PEG y puede serlo de algunos detergentes no iónicos.(12).

Por su amplio uso, es frecuente su presencia en aguas residuales, ríos, sistemas de tratamiento de aguas y en el medio ambiente en general, sumándose a los muchos contaminantes lanzados por la industria y la tecnología actual.(12).

Un aspecto muy importante en la eliminación de estos compuestos es la biodegradación, llevada a cabo por microorganismos que son capaces de metabolizarlos.

Si bien, la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente es relativamente reciente, son muchas las cepas



de microorganismos aisladas de la naturaleza que son capaces de utilizarlos como fuentes nutritivas.

### 1.1.2.MICROORGANISMOS QUE METABOLIZAN ETILENGLICOL.

#### -Bacterias del ácido acético.

Fue a finales del siglo pasado, cuando por vez primera, se demostró que el etilenglicol era metabolizado por bacterias, identificándose al ácido glicólico como subproducto.

En una extensa revisión sobre bacterias del ácido acético se citan numerosas cepas de *Acetobacter* y *Gluconobacter* que oxidan etilenglicol a glicolato (16).

Algunos investigadores de principios de siglo postularon la formación de ácido oxálico a partir de etilenglicol, pero posteriores trabajos al respecto no confirmaron dicha producción.(16).

Se ha demostrado también, que las bacterias del ácido acético pueden metabolizar parcialmente glicoles de peso molecular elevado.

Normalmente, estas bacterias requieren medios ricos para su crecimiento y, en general, crecen pobremente cuando utilizan glicoles.

#### -Levaduras.

Se ha observado la captación de oxígeno por parte de una especie de levadura, *Hansenula miso*, cuando está en presencia de determinados glicoles, sin embargo no es ca-

paz de crecer en ellos. En el medio suplementado con etilenglicol se ha aislado ácido glicólico.

-Pseudomonas sp.

Haines puso de manifiesto que Pseudomonas aeruginosa puede metabolizar varios glicoles y PEG (27).

Stanier y col. vieron que determinadas cepas clasificadas como pertenecientes al grupo de las Pseudomonas fluorescentes ( a las que pertenece P.aeruginosa ) crecían en etilenglicol como única fuente de carbono (68).

Fincher describió un microorganismo semejante a Pseudomonas aislado de suelos enriquecidos con tri-etilenglicol que a su vez podía metabolizar etilenglicol, di, tri y tetra-etilenglicol (18).

Gonzalez y col. aislaron un microorganismo halófilo, posiblemente identificado como Pseudomonas (ATCC-27042) que crecía en medios conteniendo etilenglicol, ácido glicólico y ácido glioxílico (22).

-Micobacterium sp.

El metabolismo del etilenglicol por especies de Micobacterium ha sido estudiado como un medio para la diferenciación de especies. De 132 especies examinadas, cinco cepas de M.stigmatis, cinco de M.fortuitum y una cepa no identificada, eran capaces de crecer en medios conteniendo etilenglicol como única fuente de carbono(12).

-Alcaligenes sp.

También, se ha demostrado la capacidad de algunas

especies de *Alcaligenes* de crecer a expensas de glicoles, entre ellas, *A.fecalis* es capaz de crecer en etilenglicol.

-*Acinetobacter* sp.

Se observó que especies de *Acinetobacter* aisladas de aguas residuales podían crecer en etilenglicol, di y trietilenglicol y en algunos PEG, como únicas fuentes de carbono y energía. Una de ellas mostraba una nueva vía para el metabolismo de glicoles (35, 56).

-*Flavobacterium* sp.

Child y Willets estudiaron ampliamente el metabolismo aeróbico del etilenglicol en una especie de *Flavobacterium* (8). Posteriormente, Willets, utilizando la misma cepa, se centró en el metabolismo de dicho glicol en condiciones microaerófilas, siendo distinto al anterior (77).

### 1.1.3. VIAS METABOLICAS DE ETILENGLICOL EN BACTERIAS.

Las rutas metabólicas para la degradación de etilenglicol han sido estudiadas en pocas bacterias.

El estudio del crecimiento de varias especies de *Pseudomonas* en compuestos carbonados, tales como, glioxilato, glicolato (36), glicina y oxalato, llevó a Kornberg a proponer varias rutas para estos compuestos, que coordinadas con el ciclo del ácido cítrico y el de los ácidos dicarboxílicos, proporcionaban esqueletos carbonados y energía (37).

Una vía, suponía la condensación de dos moléculas de glioxilato para formar  $\text{CO}_2$  y un compuesto de tres átomos de car-

bono que resultó ser semialdehído tartrónico en *Pseudomonas* (37) el cual es posteriormente metabolizado a través de glicerato a piruvato.

Una segunda vía suponía la condensación de glioxilato con acetil-coenzima A para formar malato (intermediario de los ciclos de los ácidos di y tricarboxílicos).

Sin embargo, el metabolismo del etilenglicol no fue estudiado por estos investigadores.

Fue Gonzalez (22) quien aportó evidencias espectrofotométricas del metabolismo del etilenglicol via glicerato en *Pseudomonas*. Observó que una suspensión celular de dicho microorganismo podía oxidar glicolato cuando había crecido en etilenglicol o en glicolato. Otro dato aportado al respecto es el crecimiento de esta cepa en glioxilato. (esquema 1).

También especies de *Flavobacterium* que son capaces de crecer en etilenglicol como única fuente de carbono y energía, metabolizan dicho glicol por oxidación del mismo a glioxilato, vía glicolato. (esquema 1). El glioxilato es metabolizado por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la malato sintasa actuando anapleroticamente. (8).

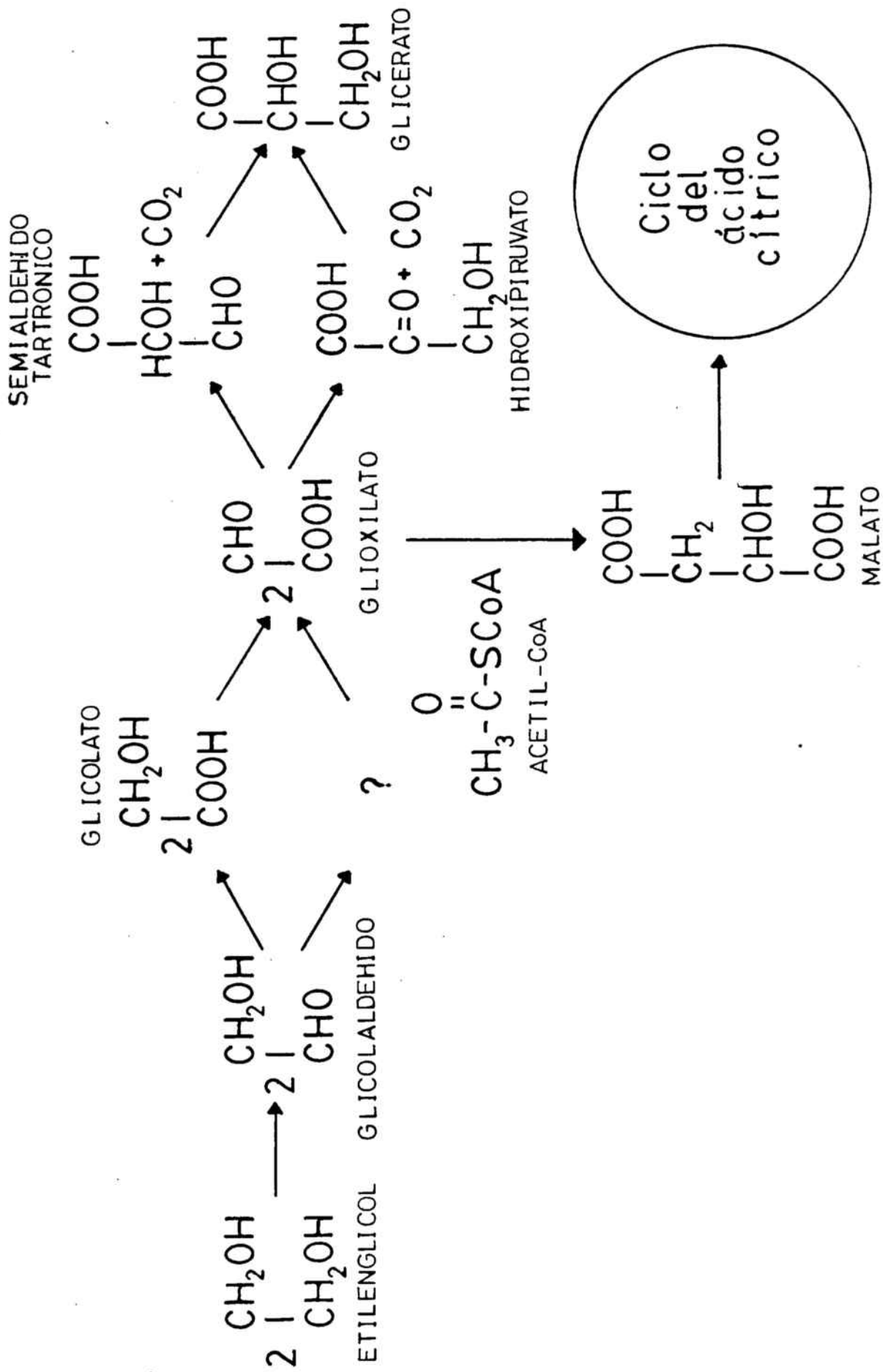
El metabolismo del etilenglicol por especies de *Acinetobacter* tiene lugar por otra vía. Cuando estas cepas han crecido en etilenglicol, los extractos celulares de las mismas metabolizan etilenglicol, glicolaldehído y ácido glioxílico, pero no ácido glicólico. No se detecta semialdehído tartrónico, sin embargo puede medirse una actividad hidroxipiruvato-

reductasa, apuntando pues, a la existencia de una ruta alternativa (esquema 1).

En el esquema 1 se representan dos posibles vías para el metabolismo del etilenglicol a glicerato en bacterias. La ruta superior se asigna a especies pertenecientes al género *Pseudomonas* y al género *Flavobacterium*; la inferior a especies de *Acinetobacter*.

Todo lo mencionado hasta ahora, se refiere al metabolismo aeróbico del etilenglicol. Sin embargo, Willets (77) vió que dicho metabolismo en especies de *Flavobacterium* está afectado por la presión de  $O_2$  disuelto en el medio de crecimiento. Así, bajo condiciones microaerófilas, parte del etilenglicol es oxidado vía glicerato a Acetil coenzimaA, subsiguientemente catabolizado a acetil fosfato y después a acetato. Adicionalmente, parte del diol es catabolizado, por una diol deshidratasa inducible, a acetaldehído y posteriormente reducido a etanol, el cual es metabolito final.

ESQUEMA 1.- VIAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL ETILEN\_  
GLICOL EN BACTERIAS.



## 1.2. METABOLISMO DEL ETILENGLICOL EN

### Escherichia coli.

#### 1.2.1. MUTANTES DE Escherichia coli CAPACES DE UTILIZAR E\_TILENGLICOL : CEPA EG3.

El metabolismo del etilenglicol en E.coli no había sido caracterizado hasta el momento. En nuestro laboratorio se están llevando a cabo, desde hace bastante tiempo, estudios sobre la utilización por E.coli de otro glicol, el 1,2-propanodiol. Por ello, hace aproximadamente dos años, se creyó de interés iniciar el estudio del metabolismo del etilenglicol en E.coli, siendo el presente trabajo continuación del mismo.

E.coli K-12 tipo salvaje (cepa 1) es incapaz de crecer en etilenglicol y no ha sido posible a partir de la misma derivar mutantes con esta nueva capacidad metabólica, ni siquiera empleando agentes mutágenos (J. Aguilar, comunicación personal). Todo ello parecía indicar que eran necesarios al menos dos cambios mutacionales independientes para la adaptación de esta cepa al crecimiento en etilenglicol.

Por ello, se pensó en derivar los mutantes capaces de utilizar etilenglicol, a partir de una cepa que ya era capaz de utilizar otro glicol, el 1,2-propanodiol (cepa 3) (apartado 1.5.1.). Así, por mutación espontánea de la cepa 3, se obtuvo la cepa EG3 que ya es capaz de crecer en etilenglicol como única fuente de carbono y energía. (apartado 2.1.).

Así pues, se pasó a caracterizar el metabolismo aeró-



bico del etilenglicol en cepas mutantes seleccionadas por su caracter etilenglicol positivo, detallado en el esquema 2 y comparado con el del 1,2-propanodiol.

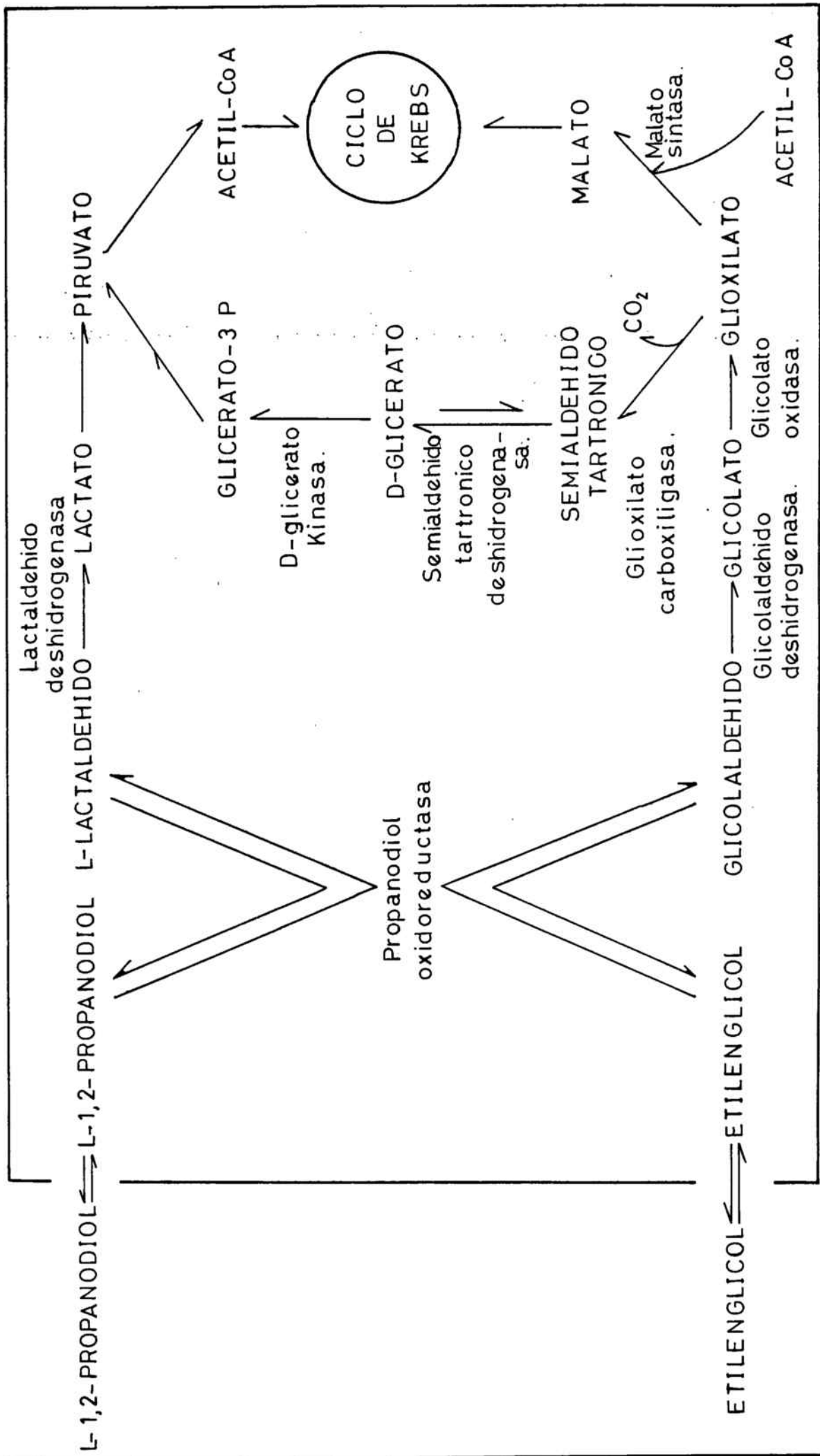
### 1.2.2. VIA METABOLICA DEL ETILENGLICOL EN MUTANTES DE Escherichia coli.

La via para el metabolismo del etilenglicol en mutantes de E.coli , entre ellos la cepa EG3, implica los siguientes pasos : 1) Entrada del etilenglicol en las células. 2) Oxidación del etilenglicol a glicolaldehido. 3) Transformación del glicolaldehido en glicolato. 4) Incorporación del glicolato formado al metabolismo general a través de glioxilato por la vía ya descrita para ambos compuestos (28,37,38,53,8).

La entrada del etilenglicol al interior de las células se realiza probablemente por difusión, ya que está descrito que este tipo de polioles de cadena corta son capaces de atravesar la membrana celular sin el concurso de sistemas de transporte específicos (42). Si bien el 1,2-propanodiol parece tener un transportador de membrana que actuaría a bajas concentraciones de dicho glicol en el medio (26).

A continuación, la oxidación del etilenglicol a glicolaldehido está catalizada por un enzima, la propanodiol oxidoreductasa (6). Este enzima está ya presente y es constitutivo en la cepa progenitora (cepa 3), desempeñando en ella un importante papel en el metabolismo del 1,2-propanodiol, puesto que oxida dicho glicol a lactaldehido. Se conocía ya la elevada actividad cruzada que la propanodiol óxido-reductasa presen-

ESQUEMA 2.- VIAS PARA LA UTILIZACION DEL 1,2-PROPANODIOL Y  
DEL ETILENGLICOL POR MUTANTES DE ESCHERICHIA  
COLI-K-12.



ataba sobre el etilenglicol (4) y teniendo en cuenta que este enzima actúa sobre el grupo alcohol primario (66) es lógico pensar que actuaría sobre el etilenglicol transformándolo en glicolaldehído.

El siguiente paso en el metabolismo del etilenglicol es la oxidación del glicolaldehído a glicolato, catalizado por el enzima "glicolaldehído deshidrogenasa", que será comentado con detalle en el apartado 1.3. debido a su importancia e interés, ya que sobre él se centra la realización de este trabajo.

La oxidación de glicolato a glioxilato está catalizada por una glicolato oxidasa ligada a FAD. Este enzima se ha descrito como inducible durante el crecimiento de E.coli en glicolato (19,53) y también en otras especies bacterianas. Además, en una especie de *Flavobacterium* se describe una glicolato oxidasa inducible, no sólo durante el crecimiento en glicolato, sino también en etilenglicol (8).

La reducción de glioxilato a glicolato está catalizada por una glioxilato reductasa dependiente de NADP.

Como muestra el esquema 2, a nivel de glioxilato, la vía metabólica presenta un punto de divergencia, puesto que este compuesto participa en dos reacciones de condensación (apartado 1.1.3.)

a) La reacción catalizada por el enzima malato sintasa, en la que a partir de una molécula de glioxilato y una de acetil-CoA se forma una de malato. (78)

b) La condensación de dos moléculas de glioxilato para dar

semialdehído tartrónico y  $\text{CO}_2$ , catalizada por el enzima glioxilato carboxiligasa (39). Esta reacción es el primer paso de la vía del D-glicerato que conduce a la síntesis de glicerato-3-fosfato.

Tanto el glicerato-3-fosfato, como el malato son compuestos que ya pueden entrar en el metabolismo central, incorporándose a la glucólisis y al ciclo de Krebs respectivamente.

Por tanto, gracias a la mencionada secuencia de reacciones, un compuesto de dos átomos de carbono como el etilenglicol es capaz de suplir las necesidades tanto energéticas, por su oxidación a  $\text{CO}_2$ , como de síntesis de componentes celulares a través de la formación de compuestos de tres y cuatro átomos de carbono, y permitir el crecimiento de mutantes de E.coli K-12 en etilenglicol como única fuente de carbono y energía.

### 1.3. GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA .

#### 1.3.1. ACTIVIDADES GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA DESCRITAS EN LA LITERATURA.

La glicolaldehido deshidrogenasa es el enzima que cataliza la oxidación del glicolaldehido a glicolato en el metabolismo del etilenglicol en mutantes de E.coli.

No ha sido estudiada ninguna vía de matabolización para el glicolaldehido, pero existen datos en la literatura que apoyan su transformación en glicolato, implicando por tanto una actividad glicolaldehido deshidrogenasa.

Así, en el estudio del posible papel del glicolaldehido como precursor en la biosíntesis de la vitamina B<sub>6</sub> (62, 72,76), se ha descrito en E.coli B, una glicolaldehido deshidrogenasa dependiente de NADP que es capaz de interconvertir glicolaldehido y glicolato, actuando en dicha cepa, como fuente de glicolaldehido a partir de glicolato (50,64). Incluso en uno de estos trabajos (64) se describe la existencia de isoenzimas de la glicolaldehido deshidrogenasa, separados por una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y que difieren en su localización subcelular y equilibrio de reacción. También hay datos sobre la distribución de esta actividad glicolaldehido deshidrogenasa en una gran variedad de especies bacterianas capaces de sintetizar vitamina B<sub>6</sub> (49).

Una actividad glicolaldehido deshidrogenasa está des-

crita también por Leblanc y Mortlock (41) en uno de los pasos de la metabolización de la D-arabinosa en un mutante de E.coli K-12. Esta cepa es capaz de utilizar D-arabinosa gracias a su capacidad de inducir los enzimas del metabolismo de la L-fucosa (apartado 1.5.2.). La D-arabinosa es metabolizada hasta fosfato de dihidroxicetona y glicolaldehído, siendo este último oxidado a glicolato por una actividad glicolaldehído deshidrogenasa no identificada por los autores,

Como puede observarse, todos estos datos mencionados describen la existencia de una actividad glicolaldehído deshidrogenasa, que actúa sobre el glicolaldehído transformándolo en glicolato, pero en ninguno de los casos se ha procedido a la caracterización del enzima responsable de la misma.

### 1.3.2. CARACTERIZACION PARCIAL DE ALGUNAS PROPIEDADES DEL ENZIMA RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA EN MUTANTES ETILENGLICOL POSITIVOS.

En nuestro laboratorio, se ha llevado a cabo con anterioridad a este trabajo, el estudio de algunas de las características de este enzima. Para ello se utilizaron dos tipos de fuentes enzimáticas: extractos celulares de la cepa EG3 y de otros mutantes etilenglicol positivos, o bien, muestras parcialmente purificadas por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex (6).

Este estudio mostró las siguientes características:

a) Constitutividad y niveles de actividad enzimática glicolaldehído deshidrogenasa en extractos celulares.- El enzi-

ma responsable de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa es sintetizado constitutivamente en la cepa mutante EG3 ( $etg^+$ ), también en su cepa progenitora: cepa 3 ( $prd^+$ ) e incluso en la cepa salvaje: cepa 1, pero los niveles de actividad enzimática en la cepa EG3 son del orden 2-3 veces superiores a los de cepa 3.

b) Cofactores.- Los extractos celulares de la cepa EG3 ensayados en distintas condiciones, muestran dos actividades glicolaldehido deshidrogenasa, una de ellas dependiente de NAD y la otra de NADP, siendo el nivel de la actividad dependiente de NAD del orden de 10 veces superior al nivel de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa con NADP como cofactor. Ambas actividades se corresponden con una única especie enzimática, puesto que 1) eluyen juntas en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex y 2) coinciden como una única banda tras revelar por actividad glicolaldehido deshidrogenasa dependiente de NAD y por actividad glicolaldehido deshidrogenasa dependiente de NADP, una separación electroforética del extracto celular de la cepa EG3 en geles de poliacrilamida.

c) pH óptimo.- El pH óptimo de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa se situa en 9,5, en un margen muy estrecho, puesto que las actividades determinadas a un pH de 9,0 y 10,0 representan ya un 59% de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa hallada a pH 9,5.

d) Especificidad de sustrato.- El estudio de la capacidad del enzima glicolaldehido deshidrogenasa de deshidrogenar otros aldehidos estructuralmente relacionados con el glicolalde-



hído, determinando la actividad según el apartado 2.4.2.1 y empleando como sustratos los siguientes compuestos : glicolaldehído, L-lactaldehído, D,L-gliceraldehído, D-gliceraldehído, propionaldehído, acetaldehído y ácido glioxílico, todos ellos a distintas concentraciones, mostró que el enzima tiene actividad sobre glicolaldehído, L-lactaldehído y L-gliceraldehído ( sobre D-gliceraldehído, la actividad es muy baja y cuando se añade este isómero no varía la actividad que el enzima presenta sobre el D,L-gliceraldehído). No presenta actividad sobre acetaldehído, ni propionaldehído ni glioxílico.

Por su poca actividad sobre el D-gliceraldehído y su elevada afinidad por el L-lactaldehído, se puede pensar que este enzima presenta estereoespecificidad por la configuración L. De igual modo, analizando las características estructurales de los aldehídos ensayados, parece ser necesaria la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono nº2, puesto que los compuestos que carecen de él, no son atacados por el enzima, mientras que los que lo poseen, si son oxidados.

e) Activadores e inhibidores.- La presencia de EDTA o glutation en la mezcla de ensayo no posee ningún efecto sobre la actividad glicolaldehído deshidrogenasa, aunque posteriormente ha sido necesario el empleo de EDTA y protectores de grupos sulfhidrilo para estabilizar al enzima en los procesos de purificación (apartado 3.2.6.).

La actividad glicolaldehído deshidrogenasa dependiente de NADP es activada por el catión  $K^+$ , mientras que, este ión no tiene ningún efecto sobre la actividad dependiente de

NAD . Todo ello parece indicar que el cofactor idóneo de la deshidrogenasa es el NAD y que el acoplamiento del NADP al enzima es más difícil, siendo favorecido por la presencia de  $K^+$  .

El sustrato de la reacción enzimática ( el glicolaldehído) tiene un efecto inhibitor a concentraciones superiores a 2 mM.

f) Constantes cinéticas.- En extractos celulares de mutantes etilenglicol positivos, el valor de la  $K_m$  hallado para el glicolaldehído es de 0,33 mM y 0,54 mM ensayado en presencia de NAD o NADP respectivamente. El valor de la  $K_m$  para los cofactores es de 0,49 mM para el NAD y de 0,80 mM para el NADP. Estos datos, al estar obtenidos en extractos celulares , deben considerarse como valores orientativos y sujetos a una posterior comprobación utilizando el enzima purificado.

La  $K_m$  para el L-lactaldehído no se determinó, pero los datos obtenidos demostraron que el enzima tenía más afinidad por el L-lactaldehído que por el Glicolaldehído, puesto que la actividad sobre el primero iba aumentando al disminuir la concentración de sustrato hasta 0,1 mM ( la mínima enzayada ) .

## 1.4. OTRAS ALDEHIDO DESHIDROGENASAS.

### 1.4.1. CONSIDERACIONES GENERALES. (34)

Durante los últimos treinta años se han descrito una gran variedad de aldehido deshidrogenasas que difieren en su especificidad por el sustrato y cofactor y también en su grado de pureza.

No se explica muy bien el papel que estas deshidrogenasas desempeñan "in vivo", salvo en algunas circunstancias, pero su presencia sugiere que deben ser útiles a la célula, aunque solo sea para eliminar los aldehidos tóxicos.

La reacción que catalizan las aldehido deshidrogenasas puede esquematizarse como sigue :



donde el coenzima es un piridinnucleotido (NAD o NADP).

Cuando A es un grupo hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), es decir cuando la reacción tiene lugar en medio acuoso, se forma el ácido correspondiente y se dice que estas enzimas pertenecen a la clase I según la clasificación dada por JaKoby (34). De este tipo son las aldehido deshidrogenasas que se presentan en este apartado.

Se ha visto que todas las aldehido deshidrogenasas presentan una serie de características comunes:

-Todas las aldehido deshidrogenasas descritas hasta el momento son inhibidas por una gran variedad de agentes que actúan sobre los grupos sulfhidrilo, dependiendo el grado de

inhibición tanto del compuesto utilizado como de la proteína ensayada. Así, el p-mercuriobenzoato es un inhibidor de todas las aldehído deshidrogenasas estudiadas.

-Efecto de los mercaptanos: muchos de estos enzimas son activados por dichos compuestos, otros en cambio, se inactivan completamente sin la presencia de los mismos (33). Todo ello conduce a pensar que los grupos -SH e incluso -S-S-, son necesarios para la actividad enzimática, pudiendo estar presentes en el centro catalítico del enzima y participar activamente en la reacción enzimática, o bien fuera del centro activo, manteniendo una configuración catalítica idónea.

-El mecanismo de acción de estos enzimas parece estar basado en la formación de un complejo ternario constituido por el enzima, el aldehído y el cofactor. El hidrogeno del aldehído aparece en el cofactor al terminar la reacción enzimática.

-Todas las aldehído deshidrogenasas utilizan como cofactor a piridin nucleótidos, la mayoría tienen preferencia por el NAD, otras por el NADP, y algunas pueden utilizar ambos. Por consiguiente, el sistema de ensayo de la actividad enzimática es sencillo y rápido, basándose en la medición del incremento de absorbancia a 340 nm., debido a la formación del dipiridin nucleótido reducido (NADH, NADPH).

-El producto de la reacción enzimática, en todos los casos estudiados, es un ácido, el correspondiente al aldehído oxidado.

Hay algunas características que no son comunes a todas las aldehído deshidrogenasas, pero sí a la mayoría:

-Especificidad de sustrato : la mayoría de estos enzimas pueden actuar sobre una gran variedad de aldehidos, incluyendo el glicolaldehido (17,32,69,3,58,63), algunas sólo sobre alifáticos, otras incluso también sobre aromáticos. Hay casos en los que se describe especificidad de sustrato (73,65).

-Se ha descrito que algunas aldehido deshidrogenasas son inhibidas por la incubación en presencia del sustrato (73), otras en cambio, no se ve afectada su actividad por esta incubación (65). También se ha observado la activación por incubación de la preparación enzimática con el cofactor (32) y en otros casos, se ha visto que la misma no produce un aumento en la velocidad de la reacción enzimática (73).

En la mayoría de ellas se observa inhibición por sustrato a elevadas concentraciones.

-Muchas de las aldehido deshidrogenasas descritas no son capaces de catalizar la reacción inversa a la oxidación del aldehido, es decir no reducen el ácido que han formado como producto. Sin embargo, la glicolaldehido deshidrogenasa descrita en la biosíntesis de la vitamina B<sub>6</sub> en E.coli B (49,50,64) si es capaz de catalizar la reacción reversiblemente, siendo además fuente de glicolaldehido a partir de glicolato en la biosíntesis de esta vitamina en dicha cepa. Asimismo, la glicolaldehido deshidrogenasa presente en la cepa EG3 y en los mutantes etilenglicol positivo, es capaz de actuar sobre el glicolato formado en la reacción de oxidación del glicolaldehido. Esto se puso de manifiesto en nuestro laboratorio dejando transcurrir la reacción enzimática según el ensayo descrito en el

apartado 2.4.2.1., la cual se seguía por el incremento de absorbancia a 340 nm. Una vez finalizada la reacción, se añadió glicolato (180 mM) a la cubeta de ensayo y se observó una disminución de la absorbancia a dicha longitud de onda, indicando que el glicolato era reducido a expensas de la oxidación del NADH a NAD (6). Dentro del grupo de aldehído deshidrogenasas que catalizan una reacción reversible de este tipo se encuentra la arilaldehído deshidrogenasa de Neurospora crassa.

Estabilidad: estos enzimas son bastante inestables, sobretodo en los pasos más avanzados de su purificación, en los que la concentración de proteína es baja. Incluso uno de los isoenzimas de una aldehído deshidrogenasa de hígado de caballo (17) es sensible a la presencia de oxígeno inactivándose rápidamente bajo estas condiciones, por lo que los autores debían trabajar en lo posible bajo atmósfera de nitrógeno. La preparación enzimática se guardaba a 4°C en nitrógeno. La explicación dada por los autores era la posible oxidación de los grupos sulfhidrilo de la proteína nativa.

Está descrito que en los procesos de diálisis la pérdida de actividad de estas aldehído deshidrogenasas es considerable, evitándose con la adición de mercaptanos o agentes protectores de grupos -SH.

Como algunas son inactivadas por la presencia de determinados metales, el empleo de EDTA es de utilidad.

#### 1.4.2. DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS.

- Aldehído deshidrogenasa de hígado de buey descrita

por Racker (58): Históricamente es importante por ser la primera aldehído deshidrogenasa que se estudió. Utiliza como cofactor solamente el NAD. Actúa sobre varios aldehídos alifáticos y aromáticos. Es muy inestable en las diálisis, recuperándose en parte la actividad por adición de cisteína. Tiene un pH óptimo de 9,3 con un límite muy estrecho.

-Aldehído deshidrogenasa de levadura, activada por  $K^+$ , descrita por Black (3): Este enzima fue uno de los primeros estudiados en este campo. Puede utilizar como cofactores NAD y NADP, siendo la actividad dependiente de NADP del orden de un 10% de la observada con NAD. Presenta actividad sobre una gran variedad de aldehídos, pero los ensayos de actividad habituales se realizaban con acetaldehído como sustrato. Es activada por iones  $K^+$  y en menor grado por  $Rb^+$  y  $Cs^+$ . No tienen ningún efecto sobre el enzima el  $Na^+$  y  $Li^+$ . Concentraciones de  $1 \times 10^{-3}$  M de 2-mercaptoetanol producen una marcada activación. Se obtiene una inactivación del orden del 50% con  $10^{-4}$  M de p-cloromercuriobenzoato. Es sensible a pequeñas trazas de Cu, pero el EDTA no protege frente a este efecto, son más efectivos los tioles. El pH óptimo es de 8,7.

-Aldehído deshidrogenasa de levadura, dependiente de NADP, descrita por Seegmiller (63) : Solo es capaz de utilizar como cofactor el NADP. Puede oxidar varios aldehídos alifáticos, pero sobre el que presenta mayor actividad es el acetaldehído y a continuación el glicolaldehído. Es activado por iones  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  sobretodo, y en menor grado por  $Mn^{2+}$  y  $Ba^{2+}$ . El pH óptimo del enzima purificado está entre 7,5-8. A pH 6,8 y 8,7



se observa ya una pérdida del 50% de la actividad.

-Aldehído deshidrogenasa de Pseudomonas fluorescens descrita por Jakoby (32) : Este enzima se caracteriza por precisar fosfato o arseniato para que la reacción enzimática tenga lugar . Utiliza como cofactor el NAD y el NADP, pero la actividad en presencia de este último es un 25% de la observada en presencia de NAD. Es activo con una amplia variedad de aldehídos tanto alifáticos como aromáticos. Cuando estos aldehídos sobrepasan la concentración idónea tienen un efecto inhibitorio. Precisa para evitar su inactivación, sobretodo en las diálisis, de tioles (bajas concentraciones de ditioles y elevadas de monotioles). La reacción catalizada por el enzima no es reversible. Es inactivado si se incuba con en el sustrato, por el contrario es activado cuando se preincuba con el cofactor.

-Aldehído deshidrogenasa de levadura descrita por Steinman y Jakoby (69): Es una de las tres especies enzimáticas aisladas de autolisados de levadura con actividad aldehído deshidrogenasa dependiente de  $K^+$  y que se denomina proteína A. El enzima es activo frente a una amplia variedad de aldehídos heterocíclicos, alifáticos y aromáticos, con amplias variaciones en las velocidades y rangos de  $K_m$ . Puede utilizar como cofactor tanto el NAD como el NADP. Se ha demostrado para este enzima la formación de un complejo ternario. Es activado por iones monovalentes, entre los que el  $K^+$  es el más efectivo. Este enzima es funcional en ausencia de mercaptanos, pero el ensayo realizado con benzaldehído en estas condiciones pierde rápidamente linealidad, la cual se recupera por adición de EDTA o glutatión. Se observa inhibición por altas concentraciones



de los aldehidos que actuan como sustrato.

-Aldehido deshidrogenasa de hígado de rata descrita por Ting (73) : Su principal característica a destacar es su especificidad de sustrato, actua solamente sobre D,L-lactaldehido y D,L-gliceraldehido. La actividad es mayor con el isómero D del lactaldehido. Utiliza como cofactor el NAD solamente. Es inhibido por p-cloromercuriobenzoato, iodoacetato. La incubación del enzima con D,L-lactaldehido en ausencia de NAD resulta en una marcada inactivación, sin embargo, la preincubación con NAD no altera la velocidad de reacción normal. El efecto del pH sobre el enzima es un tanto anómalo, puesto que la velocidad de reacción sigue aumentando con el pH incluso por encima de pH 11. El ensayo de actividad se lleva a cabo a pH 11 y no a superiores debido a la inestabilidad del lactaldehido.

-Lactaldehido deshidrogenasa de Escherichia coli descrita por Sridhara y Wu (65): Aparentemente, sólo el L-lactaldehido parece ser un buen sustrato. La concentración de L-lactaldehido en el ensayo es de 20 mM. A esta concentración el D-lactaldehido no es utilizado por el enzima pero tampoco inhibe la catálisis. A la misma concentración que el L-lactaldehido fueron ensayados otros aldehidos siendo la actividad sobre ellos nula o despreciable . Utiliza como cofactor NAD. Los grupos sulfhidrilo parecen ser necesarios para la actividad enzimática, puesto que, los ensayos de preparaciones enzimáticas en ausencia de tioles muestran sólo un 60% de la actividad obtenida cuando se realizan en presencia de glutatión. Las di-

lisis en ausencia de EDTA y  $\beta$ -mercaptoetanol llevan a la pérdida total de actividad, pero ésta puede recuperarse con una nueva diálisis en presencia de estos compuestos. Es inhibido en parte por iones  $\text{Cu}^{2+}$  y también por iodoacetato. La preincubación del enzima con NAD, o con lactaldehído, no modifica la velocidad de la reacción enzimática. La reacción no es reversible.

Las características más importantes de las aldehído deshidrogenasas descritas en este apartado se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

ALDEHIDO DESHIDROGENASA DE ...					
Propiedad	de hígado de buey (58) (3)	de levadura activada por K <sup>+</sup> (63) de NADP (63)	de levadura de Pseudomonas fluorescens (32)	de hígado de rata (73)	lactaldehído deshidrogenasa de E.coli (65)
especificidad de sustrato	amplia	amplia	amplia	D-lactaldehído D-gliceraldehído	L-lactaldehído
Km para el sustrato	1.10 <sup>-5</sup> M (acetaldehído)	1.7.10 <sup>-4</sup> M (acetaldehído)	3.5.10 <sup>-5</sup> M (acetaldehído)	1.10 <sup>-3</sup> M (glicolaldehído) (glicolaldehído) (D,L-lactaldehído)	1.3.10 <sup>-1</sup> M 1.10 <sup>-2</sup> M
producto	ácido orgánico	ácido orgánico	ácido orgánico	ácido orgánico	metilglicoxal láctico
Nucleótido	NAD	NAD o NADP	NADP	NAD o NADP	NAD
Km para el nucleótido	—	1.10 <sup>-4</sup> M (NAD o NADP)	1.4.10 <sup>-5</sup> M	3.3.10 <sup>-4</sup> M (NAD) 4.5.10 <sup>-3</sup> M (NADP)	1.10 <sup>-4</sup> M
pH óptimo	9,3	8,7	7,5-8,0	8,4	11
Inhibidores	—	PCMB	—	elevadas concentraciones de sustrato	iodoacetato Cu
Activadores	—	K <sup>+</sup> y tioles	Ca <sup>2+</sup> Ba Mg <sup>2+</sup> Mn	P <sub>i</sub> y tioles	tioles

PCMB : p-cloromercuriobenzoato  
NEM : N-etilmaleimida

## 1.5. LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA DE Escherichia coli.

Este enzima fue descrito y caracterizado por vez primera en un mutante de E.coli capaz de crecer en propanodiol como única fuente de carbono y energía (65).

### 1.5.1. METABOLISMO DEL L-1,2-PROPANODIOL EN MUTANTES DE Escherichia coli.

E.coli K-12 tipo salveje (cepa 1) es incapaz de crecer en propanodiol, sin embargo, fue posible aislar a partir de ella, mediante tratamiento con etilmetanosulfonato y subsiguientes cultivos en un medio que contenía D,L-1,2-propanodiol, un mutante capaz de crecer en propanodiol al que se denominó cepa 3 (66). Se demostró que, aunque las células habían estado expuestas a la mezcla racémica, cepa 3 únicamente era capaz de utilizar el isómero L y producía constitutivamente una deshidrogenasa dependiente de NAD que sólo actuaba sobre el L-1,2-propanodiol (propanodiol deshidrogenasa). Este enzima poseía actividad sobre otros compuestos relacionados (1,3-propanodiol, glicerol, etilenglicol y etanol) (66), actuando siempre sobre el grupo alcohol primario.

El producto de la reacción sobre el L-1,2-propanodiol era el L-lactaldehido, compuesto que era oxidado a su vez a L-lactato por mediación de una lactaldehido deshidrogenasa descrita para cepa 3 y que se halla ya presente en cepa 1 (65).

El lactato formado induce internamente una lactato des-

hidrogenasa (flavoproteína) que lo transforma en piruvato, compuesto que ya puede ser oxidado a través del metabolismo general (11).

Sridhara y Wu demostraron la directa implicación de la lactaldehído deshidrogenasa en la metabolización del L-1,2-propanodiol (65). Vieron que era un enzima sintetizado constitutivamente en cepa 3 y que también estaba presente en cepa 1. Mutantes seleccionados por su incapacidad de crecer en placas conteniendo discos impregnados de lactaldehído (carecían de actividad lactaldehído deshidrogenasa) eran también incapaces de crecer en L-1,2-propanodiol a pesar de que producían constitutivamente propanodiol deshidrogenasa (cepa 40). Por otra parte, el estudio de la radioactividad incorporada por varias cepas a partir de D,L-1,2-propanodiol marcado con  $^{14}\text{C}$ , demostró que sólo incorporaban radioactividad las cepas propanodiol positivo, sin embargo la cepa 40 a pesar de poseer propanodiol deshidrogenasa constitutiva, no utilizaba el sustrato radioactivo.

Las propiedades de dicha lactaldehído deshidrogenasa están descritas en el apartado 1.4.2.

A partir de cepa 3, sin mutagénesis y por cultivo continuado en un medio que contenía una concentración limitante de propanodiol, se seleccionó la cepa 430, capaz de utilizar el L-1,2-propanodiol a bajas concentraciones (26). Esta nueva capacidad parece ser debida al desarrollo de un sistema de transporte a través de membrana específico para dicho diol (26). Esta nueva cepa presenta además niveles constitutivos, 2-3 veces superiores a los de cepa 3, de actividad propanodiol deshidrogenasa (26)

### 1.5.2. RELACION DE LA VIA DE UTILIZACION DEL L-1,2-PROPANODIOL CON EL METABOLISMO DE LA L-FUCOSA.

La estrecha relación existente entre la ruta de degradación del propanodiol en cepa 3 y la vía de utilización de la L-fucosa en la cepa tipo salvaje se puso de manifiesto (11) basándose en una serie de evidencias: 1) la propanodiol deshidrogenasa que produce constitutivamente la cepa 3 presentaba una elevada actividad sobre varios compuestos, por lo que el estudio de su función nativa no se podía basar en su especificidad de sustrato, 2) el locus genético que confería la capacidad de producir constitutivamente esta propanodiol deshidrogenasa de origen desconocido, estaba muy cerca o coincidía con el locus que controlaba el metabolismo de la L-fucosa, 3) durante la fermentación de fucosa, E.coli excretaba al medio propanodiol.

Gracias al estudio detenido de las cepas 1,3 y 430 (24,25,26) en relación con el metabolismo de la L-fucosa y del L-1,2-propanodiol, se pudo concluir que la nueva ruta para la utilización de este último compuesto era un caso de inversión de la dirección normal de una ruta metabólica establecida, la del metabolismo de la L-fucosa, ante unas nuevas condiciones externas.

El metabolismo de la L-fucosa en la cepa tipo salvaje se realiza a través de una ruta metabólica que consta de los siguientes enzimas: L-fucosa permeasa (24), L-fucosa isomerasa (25), L-fuculosa kinasa (29) y L-fuculosa 1-fosfato aldolasa (21), todos ellos inducibles durante el crecimiento en L-fucosa, tanto aeróbica como anaerobicamente. El último enzima escinde el com-

puesto de 6 átomos de carbono que utiliza como sustrato en dos compuestos de 3 átomos de carbono: el L-lactaldehído y fosfato de dihidroxicetona. Este último es oxidado a través del metabolismo central, pero el L-lactaldehído sigue una ruta diferente según la oxigenación del cultivo. Así, aerobicamente el lactaldehído es transformado en piruvato por la acción secuencial de una lactaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD y de una lactato deshidrogenasa ligada a FAD. Sin embargo, cuando cepa 1 crece anaerobicamente en L-fucosa, el lactaldehído es transformado en propanodiol por acción de una lactaldehído reductasa, que regenera NAD, siendo el propanodiol expulsado al medio (esquema 3).

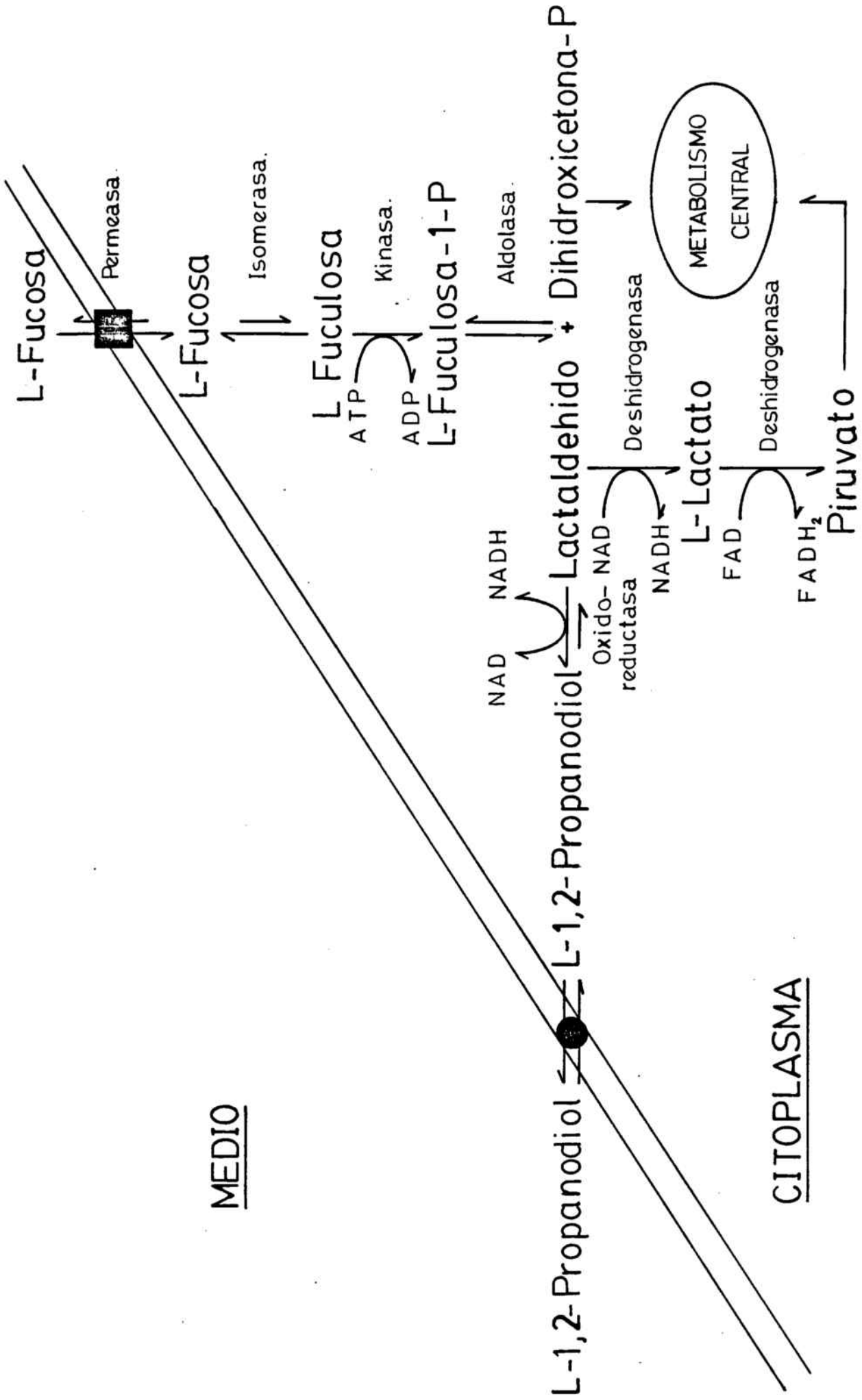
El metabolismo del L-1,2-propanodiol en las cepas mutantes 3 y 430 utiliza enzimas del metabolismo de la L-fucosa. El propanodiol es oxidado a lactaldehído (actividad deshidrogenasa) por la acción del mismo enzima que transforma el lactaldehído en propanodiol (actividad reductasa) durante la fermentación de la L-fucosa por la cepa 1. Puesto que el enzima actúa en el sentido de oxidación y también de reducción, recibe el nombre de propanodiol oxido-reductasa. El lactaldehído es metabolizado hasta piruvato de la misma forma y por mediación de los enzimas que actúan durante el crecimiento aeróbico de la L-fucosa, lactaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD y lactato deshidrogenasa ligada a FAD.

Tanto cepa 1, como cepa 3 producen constitutivamente ciertos niveles similares de lactaldehído deshidrogenasa, pero se inducen niveles más altos tanto en la cepa 1 durante el crecimiento aeróbico en fucosa, como en la cepa 3 durante el cre-

ESQUEMA 3.- METABOLISMO DEL L-1,2-PROPANODIOL (AEROBICO Y ANAEROBICO) Y SU RELACION CON EL METABOLISMO DE LA L-FUCOSA EN MUTANTES DE ESCHERICHIA COLI K-12.



MEDIO



CITOPLASMA

cimiento en propanodiol, hecho que sugería que este enzima era inducible directamente por los niveles de lactaldehído. En la cepa 430 los niveles eran más elevados (2-3 veces) y se producían constitutivamente (26).

La L-fucosa y la L-ramnosa son dos azúcares naturales que E.coli es capaz de utilizar como fuente de carbono y energía. La diferencia estructural entre ambos es la posición del radical hidroxilo de los carbonos 2 y 4.

La L-ramnosa es metabolizada en E.coli por la acción secuencial de una serie de enzimas inducibles : ramnosa permeasa (57), ramnosa isomerasa (70), ramnulosa kinasa (71,9) y ramnulosa 1-fosfato aldolasa (10,61), formándose en este punto de la vía fosfato de dihidroxicetona y L-lactaldehído. Aerobicamente, éste puede ser oxidado a piruvato por la acción de la lactaldehído deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa. Anaerobicamente se observa la excreción de propanodiol al medio, indicando que de modo semejante al caso de la L-fucosa, el lactaldehído sería reducido a propanodiol por la acción de una oxido-reductasa durante el proceso de fermentación de este azúcar.

## 1.6. POSIBLE IDENTIDAD ENTRE GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA.

El origen y la función nativa del enzima glicolaldehido deshidrogenasa involucrado en la vía de metabolización del etilenglicol en cepas mutantes de E.coli están todavía por demostrar. Lo que sí es evidente es que E.coli K-12 tipo salvaje (cepa 1) tiene ya unos niveles de actividad enzimática glicolaldehido deshidrogenasa constitutivos y que, la selección por el carácter etilenglicol positivo produce un aumento en la producción constitutiva del enzima (apartado 1.3.2.)

Podría tratarse del enzima glicolaldehido deshidrogenasa dependiente de NADP implicado en la biosíntesis de la vitamina B<sub>6</sub> en E.coli B (50,72) o de alguna aldehido deshidrogenasa de amplia especificidad (apartado 1.4.2.).

Leblanc y Mortlock (41) en el estudio del metabolismo de la D-arabinosa por inducción de los enzimas de la vía de degradación de la L-fucosa en un mutante de E.coli, describen una actividad glicolaldehido deshidrogenasa que oxida el glicolaldehido formado a glicolato, y que, ellos postulan que podría ser la lactaldehido deshidrogenasa presente en E.coli y descrita por Sridhara y Wu (65) (apartado 1.5).

Esta última suposición viene apoyada por una serie de evidencias obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio: 1) A diferencia del comportamiento del enzima frente al glicolaldehido, la actividad del enzima glicolaldehido deshidrogenasa sobre el L-lactaldehido aumenta a medida que disminuye la

concentración de sustrato (hasta 0,1 mM. que fue la mínima ensayada), lo cual indica mayor afinidad por este sustrato.

2) El estudio de los niveles de actividad glicolaldehido deshidrogenasa en las cepas 1,3 y 430 se correlaciona con el de los niveles de actividad lactaldehido deshidrogenasa en estas mismas cepas. Así, se observan niveles semejantes de actividad glicolaldehido deshidrogenasa en las cepas 1 y 3 y niveles dos veces superiores en la cepa 430, de modo similar a la actividad lactaldehido deshidrogenasa en la adaptación a la utilización del propanodiol (apartado 1.5.1.).

A pesar de estas evidencias, las características halladas en nuestro laboratorio con anterioridad para la glicolaldehido deshidrogenasa difieren en algunos aspectos con las descritas para la lactaldehido deshidrogenasa (65) (apartados 1.3.2. y 1.4.2.). Así, la lactaldehido deshidrogenasa cataliza una reacción irreversible, no es capaz de utilizar NADP como cofactor, su pH óptimo es 10,5 y utiliza específicamente el L-lactaldehido como sustrato a una concentración de 20 mM, en el ensayo. Presenta cierta actividad, aunque muy baja, sobre D,L-gliceraldehido, y propionaldehido; carece de actividad sobre acetaldehido. Lamentablemente, no se hizo referencia alguna a cerca de la actividad del enzima sobre el glicolaldehido.

La posible identidad entre ambas actividades (glicolaldehido y lactaldehido deshidrogenasas) como pertenecientes a una única especie enzimática está siendo estudiada en nuestro laboratorio desde varios puntos de vista. El que concierne a la realización de este trabajo es la purificación del enzima

glicolaldehido deshidrogenasa de cepa EG3 y ver si, con el proceso de purificación diseñado para este enzima se consigue la co-purificación de la lactaldehido deshidrogenasa y, si se mantiene la relación glicolaldehido deshidrogenasa/lactaldehido deshidrogenasa en la misma proporción a lo largo de todo el proceso. Además se aportan datos electroforéticos de extractos celulares de mutantes etilenglicol positivo (cepa EG3) y de mutantes que carecen de actividad lactaldehido deshidrogenasa (cepa 40), revelados por ambas actividades.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

## 2.1. CEPAS BACTERIANAS.

Se incluyen en este apartado, las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo y sus progenitoras y relacionadas.

- La cepa de tipo salvaje: Escherichia coli K-12, conocida también como cepa E-15 (1) y que denominaremos cepa 1.

- Cepa 3: derivada de cepa 1 por mutagénesis con etilmetanosulfonato y seleccionada por su capacidad de crecer en medios con L-1,2-propanodiol como única fuente de carbono y energía (65).

- Cepa 430: derivada espontáneamente de cepa 3 y seleccionada por su capacidad de crecer a bajas concentraciones de L-1,2-propanodiol (26).

- Cepa 40: derivada de cepa 3 y seleccionada por su incapacidad de crecer en propanodiol, por carecer de actividad lactaldehído deshidrogenasa (65).

Estas cuatro cepas han sido cedidas por E.C.C.Lin, Departamento de Microbiología y Genética Molecular. Harvard Medical School. Boston, Massachusetts. U.S.A.

- Cepa G3: derivada de cepa 3 (glicolato negativa) por mutación espontánea y seleccionada por su reversión al carácter glicolato positivo (5).

- Cepa EG3: derivada de cepa G3 por mutación espontánea y seleccionada por su capacidad de crecer en medios con etilenglicol como única fuente de carbono y energía (5). Por ser la que presenta niveles enzimáticos más elevados, se utilizó en el proceso de purificación de la glicolaldehído deshidrogenasa.

## 2.2. CONSERVACION Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS.

Las cepas bacterianas se conservaban en tubos de agar inclinado (Antibiotic medium n°3) a 0-4°C y se resembraban cada dos meses. Periodicamente se recomprobaba el fenotipo de cada cepa. Además, se disponia de cada una de las cepas en forma liofilizada, a fin de garantizar el fenotipo original de las mismas (60).

Para el crecimiento de las bacterias se empleaban medios de cultivo que constaban de un medio mineral mínimo al que se adicionaban las fuentes de carbono deseadas a partir de soluciones más concentradas.

La composición del medio mineral mínimo era :  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 34 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 64 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, FeSO<sub>4</sub> 10<sup>-3</sup> mM, MgSO<sub>4</sub> 0,3 mM, y CaCl<sub>2</sub> 10<sup>-2</sup> mM. La solución se ajustaba a pH 7,0 con HCl.

Las fuentes de carbono se adicionaban a este medio basal inorgánico a fin de quedar a una concentración final de 60 mM carbono. Así, los medios con etilenglicol se preparaban a 30 mM, los de fucosa y ramnosa a 10 mM. Los medios con hidrolizado de caseína al 0,5%. Para los crecimientos en medio sólido se adicionaba 1,5% de agar.

Los crecimientos aeróbicos se realizaban en matraces de erlenmeyer de 2 l., parcialmente llenos (500 ml.) con el medio de cultivo correspondiente, a una temperatura de 37°C e incubados en un agitador orbital (250 r.p.m.).



El crecimiento de estos cultivos se seguía en un colorímetro Klett-Summerson (filtro n°42). En estas condiciones de trabajo, una unidad Klett se corresponde a una densidad de  $4 \times 10^6$  células por ml. de cultivo.

Periodicamente, para comprobar la identidad del cultivo se practicaba el ensayo de infección con el bacteriofago P1 específico para E. coli.

### 2.3. OBTENCION DE EXTRACTOS CELULARES.

Los cultivos se recogían mediante centrifugación al final de la fase exponencial de crecimiento. Las células se resuspendían en solución amortiguadora fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3, y se volvían a centrifugar, con lo que quedaban perfectamente lavadas. Seguidamente, se resuspendían en la misma solución amortiguadora ya citada, en un volumen 4 veces superior al peso húmedo de las células. Hasta este punto el proceso se llevaba a cabo a una temperatura entre 0-4°C. A continuación, las células eran sometidas a una desintegración ultrasónica en un sonicador MSE de 150 vatios, a una amplitud de onda que oscilaba entre 12-24 micrones según el volumen de muestra, a razón de 30 segundos por mililitro de suspensión. Durante este proceso de sonicación las muestras se refrigeraban por medio de un baño de hielo a -20°C. Los extractos así obtenidos se centrifugaban a 30.000 x g durante 30 minutos a 0-4°C. El sobrenadante se empleaba como "extracto celular".

A fin de eliminar la NADH oxidasa presente en los extractos celulares de 30.000 x g que interfiere en cierto modo en la determinación de la actividad lactaldehído deshidrogenasa, cuando se pretendía medir dicha actividad enzimática en extractos celulares, se procedía a la obtención de los mismos por centrifugación de la suspensión sonicada a 100.000 x g en una ultracentrifuga Beckman L5-65B.

## 2.4. TECNICAS DETERMINATIVAS.

### 2.4.1. DETERMINACION DE PROTEINA.

La concentración de proteína se determinaba por el método del Biuret o por el método de Lowry dependiendo de la concentración de proteína de las muestras.

#### 2.4.1.1. DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DEL BIURET.

Este método se empleaba para determinar concentraciones de proteína del orden de 1 a 10 mg/ml. Para ello se seguía la técnica descrita por Gornall y col. (23). A 0,5 ml. de la solución de proteína se añadían 2 ml. del reactivo de biuret ( $\text{CuSO}_4$  6mM,  $\text{NaKC}_4\text{O}_6$  21,5 mM y NaOH 750 mM). Se dejaba a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir el desarrollo de color. A continuación se leía la absorbancia a 550 nm. en un colorímetro Spectronic 80 (Bausch & Lomb). Paralelamente se trataba del mismo modo una curva de calibración preparada con albúmina sérica bovina.

#### 2.4.1.2. DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY. (47)

Este método se utilizó para determinar bajas concentraciones de proteína, del orden de 20 a 200  $\mu\text{g/ml}$ . A 0,5 ml. de la solución protéica se le adicionaban 2,5 ml. de la siguiente solución:  $\text{NaKC}_4\text{O}_6$  1mM,  $\text{CuSO}_4$  0,4 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M y NaOH 0,1 N. A continuación y manteniendo el tubo en vigorosa agitación se añadía 250  $\mu\text{l}$ . de reactivo de fenol según Folin-Ciocalteus. Se

dejaba 30 minutos a temperatura ambiente formándose un complejo coloreado cuya absorbancia se medía a 750 nm. (Spectronic 80 Bausch & Lomb).

Para evitar las interferencias producidas por el EDTA se seguía una modificación del método de Lowry, descrita por Bensadoun y Weinstein (2). A un volumen de 200  $\mu$ l. de la solución protéica se añadían 20  $\mu$ l. de deoxicolato sódico al 0,2% y se agitaba fuertemente dejándose a continuación 15 minutos en reposo a temperatura ambiente. Seguidamente, se precipitaba la proteína por adición de 200  $\mu$ l. de ácido tricloroacético al 13% dejándose a 0-4°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugaba a 3.000 r.p.m. en una centrifuga MSE Mistral 2L durante 30 minutos. Trás retirar el sobrenadante por decantación se le añadía al precipitado 2ml. del mismo reactivo utilizado en el método de Lowry ya descrito. Trás dejarlo 10 minutos a temperatura ambiente se añadían 200  $\mu$ l. del reactivo de fenol y se procedía del mismo modo que en el caso anterior.

En ambos métodos, paralelamente a cada ensayo de determinación protéica se hacía una curva patrón con albúmina sérica bovina a concentraciones entre 0-200  $\mu$ g.

#### 2.4.2. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Todas las determinaciones de actividades enzimáticas se han realizado mediante métodos espectrofotométricos. Se han empleado cubetas de 1 ml., con un paso de luz de 1 cm.,

y en todos los casos el volumen total de la mezcla de reacción era de 1ml.

Todos los ensayos se han llevado a cabo a 25°C en un espectrofotómetro de doble haz Beckman DB-GT, con registrador gráfico incorporado.

Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto.

La actividad específica se expresa como unidades por miligramo de proteína.

#### 2.4.2.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

La actividad glicolaldehido deshidrogenasa dependiente de NAD se ha determinado midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm., debido a la formación de NADH en una mezcla de reacción que consistía en: solución amortiguadora Glicina-NaOH pH 9,5, 100 mM; NAD 2,5 mM y glicolaldehido 1 mM. La reacción se iniciaba por adición de la fuente enzimática.

Bajo estas condiciones, la oxidación de 1  $\mu$ mol de glicolaldehido por cubeta correspondía a un aumento de absorción de 6,22 unidades

#### 2.4.2.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA.

La actividad lactaldehido deshidrogenasa se ha deter-

minado según una modificación del ensayo descrito por Sridhara y Wu (65).

Se medía el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH, en una mezcla de reacción cuyo volumen total era de 1 ml., que consistía en: solución amortiguadora Glicina-NaOH 100 mM (pH 10,5), glutation 1 mM, NAD 2,5 mM y lactaldehído 0,05 mM. La reacción se iniciaba por adición de la fuente enzimática.

Bajo estas condiciones, la oxidación de 1  $\mu$ mol de lactaldehído por cubeta correspondería a un aumento de absorción de 6,22 unidades.

## 2.5. TECNICAS ELECTROFORETICAS .

### 2.5.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.

En esta técnica, las proteínas se separan a lo largo del gel según su peso molecular y carga.

Se siguió el método descrito por Laemli (40) adaptado a condiciones no desnaturalizantes y efectuado en placa.

Los geles de poliacrilamida se preparaban al 7,5%.

Se disponía de placas de vidrio de 14x16 cm. separadas entre si 1,5 mm mediante espaciadores adecuados y selladas con agar.

La composición del gel separador (poliacrilamida al 7,5%) era la siguiente: acrilamida-N-N'bismetilenacrilamida (75:2,25), Tris-HCl 0,375 M (pH 8,6). La polimerización se iniciaba por adición de 0,05% V/V de tetrametilenetilendiamino (TEMED) y 0,075% P/V de persulfato amónico. Rapidamente, esta solución era aplicada mediante una pipeta entre las placas de vidrio (previamente atemperadas a 37°C) hasta una altura de unos 9 cm. desde la base. Antes de que se iniciara la polimerización, se depositaba cuidadosamente sobre la superficie del gel una fina capa de agua destilada a fin de obtener una superficie perfectamente plana. Se dejaba polimerizar 15 minutos a 37°C.

Pasado este tiempo, se retiraba la mencionada capa de agua, se introducía entre las placas un "formador de bolsi-

llos" de metacrilato y se procedía a aplicar el gel superior (stacking gel) preparado al 5%, cuya composición era la siguiente: acrilamida-N-N'bismetilenacrilamida (100:15), Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), polimerizándose del mismo modo descrito para el gel separador. Se introducía entre las placas de vidrio quedando a una altura aproximada de 1 cm. Se dejaba 15 minutos a 37°C para que tuviera lugar la polimerización. A continuación se retiraba el molde de metacrilato que había formado los bolsillos y se procedía a lavarlos con agua destilada a fin de eliminar posibles restos de acrilamida que podrían polimerizar posteriormente e interferir con la aplicación de las muestras.

Las placas de electroforesis así preparadas eran estables 2-3 días a 0-4°C.

Las muestras protéicas a separar (máximo 200  $\mu$ l.) que contenían 5% de sacarosa y 0,0125% de azul de bromofenol, se aplicaban en los bolsillos, donde quedaban perfectamente depositadas debido a su mayor densidad. Se acoplaban a la placa dos cubetas, una superior con el electrodo negativo y otra inferior con el electrodo positivo. Se aplicaba una intensidad de 15 mA. cuando la muestra estaba en el gel superior (stacking gel), aumentándose a 20-30 mA. cuando la misma había entrado en el gel separador. El proceso se dejaba transcurrir a temperatura ambiente, acoplado un sistema refrigerador por aire, hasta que el frente de azul de bromofenol llegaba a 0,5 cm. de la parte inferior del gel (aproximadamente 3 horas). El tampón de las cubetas que contenía : 0,025 M tris, 0,192 M glicina (pH 8,3), se cambiaba aproximadamente cada hora en la cubeta superior.



### 2.5.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS.

En ésta técnica las proteínas se separan según su peso molecular, puesto que el SDS las desnaturaliza y las envuelve confiriéndoles a todas ellas carga negativa. Se siguió el método descrito por Laemmli (40).

En este caso, los geles de poliacrilamida se preparaban al 10%.

El procedimiento seguido era exactamente igual al descrito en el apartado 2.5.1., con las siguientes modificaciones:

- La proporción de acrilamida-N-N'bismetilenacrilamida en el gel separador era de 100:3.
- En la composición, tanto del gel separador, como del stacking gel, se incluía SDS al 0,1%.
- El tampón de las cubetas contenía SDS al 0,2%.
- Las muestras antes de ser aplicadas en los bolsillos se sometían al siguiente tratamiento: se les añadía SDS al 5% P/V, mercaptoetanol al 5% V/V, EDTA al 0,33% P/V y tris 0,125 M (pH 6,8). Se mantenían 3 minutos a 100°C a fin de conseguir la disociación de las proteínas. Después de dejarlas enfriar se les adicionaba sacarosa al 5% y azul de bromofenol al 0,0125%, se introducían en los bolsillos y se procedía a separarlas electroforéticamente tal como se ha indicado en el apartado 2.5.1.

### 2.5.3. REVELADO DE LOS GELES POR PROTEINA.

Una vez finalizado todo el proceso, se sacaba el gel

después de des-sellar las placas, y se sumergía en una solución que contenía: azul brillante de Coomassie R-250 al 0,2%, alcohol isopropílico al 25% y ácido acético al 10%, durante una hora los geles de poliacrilamida al 7,5% sin SDS; y durante dos horas los que habían sido tratados con SDS.

Transcurrido este tiempo, se procedía a eliminar el colorante no fijado a las proteínas por lavados sucesivos con una solución de alcohol isopropílico al 25% y ácido acético al 10%. Posteriormente se conservaban con acético al 10% y en estas condiciones eran estables durante unos meses.

#### 2.5.4. REVELADO DE LOS GELES POR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Las actividades enzimáticas que se pretendía detectar después de su separación electroforética eran las siguientes: glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa.

El método utilizado es una modificación del descrito por Gabriel (20) y está basado en la visualización de las bandas de actividad deshidrogenasa mediante el acoplamiento de una reacción indicadora de color, que implica la reducción de una sal de tetrazolio al correspondiente formazan (coloreado) utilizando fenacina metasulfato (PMS) como intermediario en el transporte electrónico.

Una vez finalizada la separación electroforética en condiciones no desnaturizantes, se sacaba el gel de las placas y se introducía en un recipiente que contenía la solución

reveladora preparada recientemente. La composición de la misma, según se tratara de revelar la actividad glicolaldehido deshidrogenasa o lactaldehido deshidrogenasa, era la siguiente:

- Actividad glicolaldehido deshidrogenasa: solución glicina-NaOH 100 mM (pH 9,5), NAD 5mM, glicolaldehido 1,6 mM, NBT 0,3 mg/ml., PMS 0,1 mg/ml.

- Actividad lactaldehido deshidrogenasa: solución glicina-NaOH 100 mM (pH 10,5), NAD 5 mM, lactaldehido 0,5 mM, NBT 0,3 mg/ml., PMS 0,1 mg/ml.

Los geles totalmente sumergidos en esta solución se incubaban a 37°C en completa oscuridad durante 15-20 minutos. Posteriormente, se sumergían en una solución de ácido acético al 10% y en estas condiciones el color de las bandas correspondientes a las actividades enzimáticas es estable durante algunos meses.

## 2.6. TECNICAS CROMATOGRAFICAS.

Para evitar exposiciones redundantes, las técnicas cromatográficas, así como la precipitación con sulfato amónico, utilizadas en la purificación del enzima glicolaldehido deshidrogenasa, se detallaran en el apartado correspondiente de resultados.

## 2.7. PREPARACION DEL LACTALDEHIDO.

### 2.7.1. SINTESIS DE LACTALDEHIDO.

El L-lactaldehido no es un producto comercial, por lo que para disponer del mismo era necesario proceder a su síntesis. Para ello se siguió el método descrito por Zagalak y col. (79) en donde el L-lactaldehido es sintetizado a partir de D-treonina por reacción con la ninhidrina.

Se disolvían 3 g. de D-treonina y 9,1 g. de ninhidrina en 600 ml. de solución amortiguadora citrato sódico 50 mM ajustada a pH 5,4. Se calentaba a ebullición durante 15 minutos, manteniendo la mezcla en vigorosa agitación. Se dejaba enfriar y se filtraba (papel Whatman n°1).

El filtrado se trataba con resina de intercambio aniónico Dowex 1 x 8 100 en forma bicarbonato hasta obtener un pH de 6,5. Después se ajustaba a pH 4,0 con resina de intercambio catiónico Dowex 50 x 8 50 en forma H<sup>+</sup>.

Se concentraba en un rotavapor (40°C y 20 mm Hg) hasta un volumen de 40 ml. El concentrado, así obtenido se trataba de nuevo con las resinas de intercambio iónico, tal como se ha indicado anteriormente. Finalmente, se concentraba hasta un volumen de 20 ml. y se volvía a repetir el tratamiento con las resinas de intercambio iónico (3 ó 4 veces) hasta conseguir la completa decoloración de la solución. El pH final de la misma era de 4,0.

La concentración de lactaldehido en este paso se

determinaba según el método que se detallará en el apartado 2.7.3.1.

#### 2.7.2. PURIFICACIÓN

tos de productos contaminantes que interferían en la medición de la actividad enzimática lactaldehído deshidrogenasa. Por ello, se pensó en purificarlo por cromatografía siguiendo una modificación del método descrito por Isherwood y Hanes (31) para la separación de ácidos orgánicos, empleando una mezcla de n-propanol y amoníaco.

Se ha empleado la técnica de cromatografía ascendente, en papel Whatman nº3 (chroma) previamente lavado cromatográficamente con un solvente de igual composición al empleado posteriormente para la separación cromatográfica, en este caso n-propanol-amoniaco (60:40).

Las dimensiones del papel empleado eran de 17,5x18 cm. Las muestras se aplicaban a una distancia de 2,5 cm. del borde inferior del papel y con una separación entre ellas de 1,5 cm.

La muestra a aplicar era la siguiente: la solución final del lacataldehído, obtenida por la síntesis mencionada anteriormente, se concentraba hasta pocos ml. en rotavapor (40°C y 20 mm Hg). Este concentrado era liofilizado, obteniéndose así un líquido aceitoso, que posteriormente se disolvía en la mínima cantidad de etanol al 20%. De esta solución, se depositaba un máximo de 10 µl. en cada aplicación.

El eluyente se añadía a la cubeta en un volumen total de 200 ml. y 24 horas antes de iniciar la cromatografía para permitir la saturación de la cubeta. El solvente se dejaba fluir hasta alcanzar una altura de 14 cm. desde la línea de aplicación.

Una vez seco el cromatograma, el lactaldehído se ponía de manifiesto rociando una esquina del cromatograma con un nebulizador al 0,4% de 2,4-dinitrofenilhidracina en HCl 2 N: los compuestos carbonílicos dan manchas amarillas (14). Las manchas correspondientes al lactaldehído, que a su vez eran fluorescentes a la luz UV, se recortaban y a continuación, se procedía a la elución del lactaldehído de las mismas por adición de 100  $\mu$ l. de agua destilada y centrifugación a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga Janetzki T32C. Esta operación se repetía cuatro veces con cada uno de los fragmentos del cromatograma.

Las soluciones acuosas se reunían y concentraban en un rotavapor. La solución final se valoraba por formación de la semicarbazona correspondiente (apartado 2.7.3.2.) y así servía como sustrato en los ensayos de actividad lactaldehído deshidrogenasa.

### 2.7.3. VALORACION DEL LACTALDEHIDO.

Se utilizaban dos métodos de valoración, dependiendo de la cantidad de muestra disponible.

### 2.7.3.1. VALORACION DEL LACTALDEHIDO POR IODIMETRIA.

Para la determinación del lactaldehido obtenido según la síntesis descrita por Zagalak y col. (apartado 2.7.1.) se seguía una técnica volumétrica basada en la capacidad de unión del aldehido con el bisulfito (7). Las soluciones de lactaldehido eran tratadas con un exceso de bisulfito sódico. Se adicionaba la cantidad suficiente de yodo para oxidar el bisulfito libre a sulfato. La adición posterior de bicarbonato sódico descomponía el complejo aldehido-bisulfito, liberándose este último compuesto que podía ser valorado iodimetricamente.

En un matraz de erlenmeyer de 100 ml. se mezclaban 0,5 ml. de la solución de lactaldehido con 5 ml. de bisulfito sódico 0,25 M; se añadían de 20-25 ml. de agua destilada lavando las paredes del matraz y se dejaba en reposo durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadían 5 gotas de solución de engrudo de almidón (indicador) y desde una bureta se adicionaba iodo 0,1N para eliminar el exceso de bisulfito no unido al aldehido. A continuación, se trataba con 1-2 g. de bicarbonato sódico y se procedía a valorar el bisulfito liberado con iodo 0,1N, que era proporcional a la cantidad de lactaldehido de la muestra.

### 2.7.3.2. VALORACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL LACTALDEHIDO.

El método espectrofotométrico utilizado en este trabajo para valorar el lactaldehido es una modificación del descrito por Olson (52), basado en la reacción del aldehido con semicarbácida para dar la semicarbazona correspondiente, sien-

do la formación de la misma, proporcional a la cantidad de aldehído presente en las muestras, pudiendo determinarse por medición de la absorción a 252 nm.

Este método se utilizó para valorar el lactaldehído purificado por cromatografía (apartado 2.7.2.).

Paralelamente a cada determinación de lactaldehído, se construía una curva patrón con glicolaldehído a concentraciones entre 0-1,5 mM., la cual era tratada del mismo modo que la solución problema. La mezcla de ensayo contenía en un volumen total de 1 ml.: hidrocioruro de semicarbacida 200 mM y el aldehído a determinar, o el patrón. Se dejaban en contacto durante unas horas a temperatura ambiente para que tuviera lugar la reacción. Posteriormente, se medía la absorbancia a 252 nm en un espectrofotómetro Beckman DB-GT. La linealidad, entre la absorbancia a 252 nm y la concentración de aldehído, se mantiene siempre que ésta última no sea superior a 1,5 mM.

#### 2.7.4. DESDIMERIZACION DEL LACTALDEHIDO.

Las soluciones de L-lactaldehído preparadas y valoradas tal como se indica en los apartados correspondientes al bloque 2.7. se desdimerizaron según el método descrito por Huff (30).

La solución de L-lactaldehído (0.03 M) se calentaba a 80°C, durante 10 minutos, en presencia de ácido perclórico (0,13M). A continuación, se neutralizaba con hidróxido sódico.

Las soluciones de L-lactaldehído, así desdimerizadas, se usaron en los análisis del enzima purificado.



## 2.8. TRATAMIENTO DE MATERIALES Y PRODUCTOS.

### 2.8.1. TRATAMIENTO DE MEMBRANAS DE DIALISIS.

Las membranas de diálisis, después de lavadas con agua y etanol, se trataban con 1 l. de solución de bicarbonato sódico 10 mM (1 hora) y posteriormente con 1l. de solución de EDTA 1 mM (1hora). Trás lavar con agua destilada, se guardaban en solución de azida al 1% a 0-4°C. Antes de ser utilizados, debían lavarse con agua destilada y con la solución amortiguadora de pH que se fuera a utilizar.

### 2.8.2. REGENERACION DE MATRICES CROMATOGRAFICAS.

Todas aquellas matrices cromatográficas que se utilizan por su capacidad de unir proteínas, ya sea como intercambiadores de iones, o por afinidad, deben ser regeneradas después de su uso, a fin de eliminar las proteínas que hayan podido quedar fijadas a las mismas.

- Regeneración de AGNAD (agarosa-NAD).- Después de cada uso, se lavaba exhaustivamente con una solución 2M KCl/6M urea (45).

- Regeneración de Afi-gel blue.- Se procedía a regenerarla, después de cada uso, con una solución de urea 8M. Posteriormente y al igual que en el caso anterior, se equilibraba con la solución amortiguadora de pH inicial.

- Regeneración de DEAE-sephadex.- Después de cada uso, se regeneraba por aplicación de una fuerza iónica elevada. Se la-

yaba la matriz con la solución amortiguadora empleada en el proceso de purificación, a la que se añadía NaCl 1M. Posteriormente se equilibraba con el tampón inicial.

- Regeneración de carboximetil-celulosa.- Después de cada uso, la matriz se regeneraba por tratamiento con NaOH 0,3N y HCl 0,3N, lavando con agua entre los mismos y al final. Posteriormente, se equilibraba con la misma solución amortiguadora de pH que se iba a utilizar después, pero preparada a doble concentración, hasta ajustar el pH. Luego se dejaba una noche lavando con el tampón deseado a la concentración habitual, se comprobaba el pH y se procedía a empaquetar la columna.

- Regeneración de Dowex 1 x 8 100.- Después de su uso, se trataba con NaOH a fin de dejar la matriz en la forma  $\text{OH}^-$ . Trás lavar con agua destilada hasta neutralizar, el paso a la forma bicarbonato se efectuaba por tratamiento con bicarbonato sódico 1N. Posteriormente se neutralizaba por lavados sucesivos con agua destilada.

- Regeneración de Dowex 50 x 8 50 .- Después de su uso, se lavaba con agua hasta que las soluciones de lavado no fueran coloreadas. Seguidamente, se trataba con HCl 1N a fin de dejar la matriz en forma  $\text{H}^+$ . Posteriormente se neutralizaba por lavados sucesivos con agua destilada.

## 2.9. PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.

Los productos químicos y bioquímicos utilizados en la realización de este trabajo han sido suministrados por las siguientes firmas comerciales:

- BDH CHEMICALS.

deoxicolato sódico.

- BIO-RAD LABORATORIES.

acrilamida

Afi-gel blue

azul brillante de Coomassie R-250

dodecilsulfato sódico

N-N'metilenbisacrilamida

persulfato amónico

TEMED

- CARLO ERBA.

etilenglicol p.a.

metabisulfito sódico p.a.

- DIFCO.

antibiotic medium n°3

Bacto-agar

Bacto-casaminoacidos

- HOPKIN and WILLIAMS PROBUS.

ácido acético

propan-2-ol

urea

- LKB.

ultrogel ACA-34

ultrogel ACA-44

## - MERCK.

ácido sulfúrico  
azida  
azul de bromofenol  
bicarbonato sódico  
citrato trisódico  
cloruro ferroso  
cloruro manganoso  
cloruro de magnesio  
cloruro potásico  
cloruro sódico  
2,4-dinitrofenilhidracina  
EDTA  
etanol  
fosfato monosódico  
fosfato disódico  
glicerol  
glicina  
hidrocloruro de semicarbácida  
hidróxido sódico  
iodo resublimado  
ioduro potásico  
2-mercaptoetanol  
D,L-propanodiol  
sulfato amónico  
sulfato de cobre  
tartrato sódico potásico

## - PANREAC.

ácido clorhídrico  
ácido tricloroacético  
hidroxido amónico

## - PHARMACIA FINE CHEMICALS.

azul dextrano 2000  
DEAE-sephadex A-50

## - P.L. BIOCHEMICALS.

AGNAD type 1

-SIGMA CHEMICAL CO.

albúmina sérica bovina  
azul de nitrotetrazolio  
Dowex 1 x 8 100  
Dowex 50 x 8 50  
fenacina metasulfato  
L-fucosa  
L-gliceraldehido  
NAD ácido grado III  
ninhidrina  
L-ramnosa  
reactivo de fenol según Folin-Ciocalteus  
D-treonina  
Tris.

- WHATMAN.

carboximetilcelulosa CM-34  
papel whatman Chroma n°1  
" " " n°3

### 3. RESULTADOS.

### 3.1. EXTRACTO CELULAR Y SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

El proceso de purificación de la glicolaldehido deshidrogenasa ha sido diseñado a partir del extracto celular de la cepa EG3, pues es la que presenta niveles de actividad más elevados.

El extracto celular se obtenía a partir de 5 l. de cultivo de la cepa EG3 crecida en hidrolizado de caseína al 0,5%, tal como se indica en el apartado 2.3., usando como solución amortiguadora de pH la de fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 y que se utilizó después a lo largo de todo el proceso de purificación. Sin embargo, en un principio se había usado la solución tris-HCl 10 mM pH 7,3 para este fin, a la que se añadió posteriormente EDTA y mercaptoetanol para estabilizar al enzima, sobretudo en las diálisis.

Para evitar los problemas que el tris presentaba en las cromatografías de gel filtración (apartado 3.2.4.), se procedió a cambiar el tampón tris por el de fosfatos. Esta es la causa de que ciertas cromatografías en columna se desarrollaran con solución amortiguadora de pH tris-HCl 10 mM pH 7,3, puesto que fueron probadas en un principio y así están descritas en esta memoria.

La actividad enzimática glicolaldehido deshidrogenasa ensayada en los extractos celulares de la cepa EG3 según se indica en el apartado 2.4.2.1. era de 0,35-0,4 U/mg. de proteína.

La actividad lactaldehido deshidrogenasa ensayada en los mismos extractos celulares, tal como se indica en el apar-

tado 2.4.2.2., era de 0,2-0,25 U/mg, cuando se usaba como sustrato lactaldehído purificado por cromatografía en papel (apartado 2.7.2.) siendo suficiente una concentración de lactaldehído en la cubeta de ensayo de 0,05 mM.

Sin embargo, cuando esta misma actividad se ensayaba utilizando como sustrato el lactaldehído obtenido por la síntesis descrita en el apartado 2.7.1. sin posterior purificación, la concentración idónea de sustrato en la cubeta de ensayo era 14 mM, manteniendo las demás condiciones iguales a las descritas en el apartado 2.4.2.2. La actividad enzimática lactaldehído deshidrogenasa ensayada en estas condiciones era de 0,015-0,02 U/mg (del orden de 10-15 veces inferior a la hallada utilizando lactaldehído purificado como sustrato).

A la vista de los resultados, en todos los ensayos de actividad lactaldehído deshidrogenasa realizados en los experimentos que constituyen este trabajo, se utilizó lactaldehído purificado como sustrato.

Así mismo, se realizó una separación electroforética en geles de poliacrilamida del extracto celular de la cepa EG3 (apartado 2.5.1.), revelando a continuación por actividad glicolaldehído deshidrogenasa y por actividad lactaldehído deshidrogenasa (apartado 2.5.4.) y curiosamente, se observó que el revelado era idéntico para ambas actividades (figura 1).

La banda "a", cuyo  $R_f$  es de 0,38, se identificaba con la glicolaldehído deshidrogenasa.

La banda "b", cuyo  $R_f$  es de 0,49, aparecía también

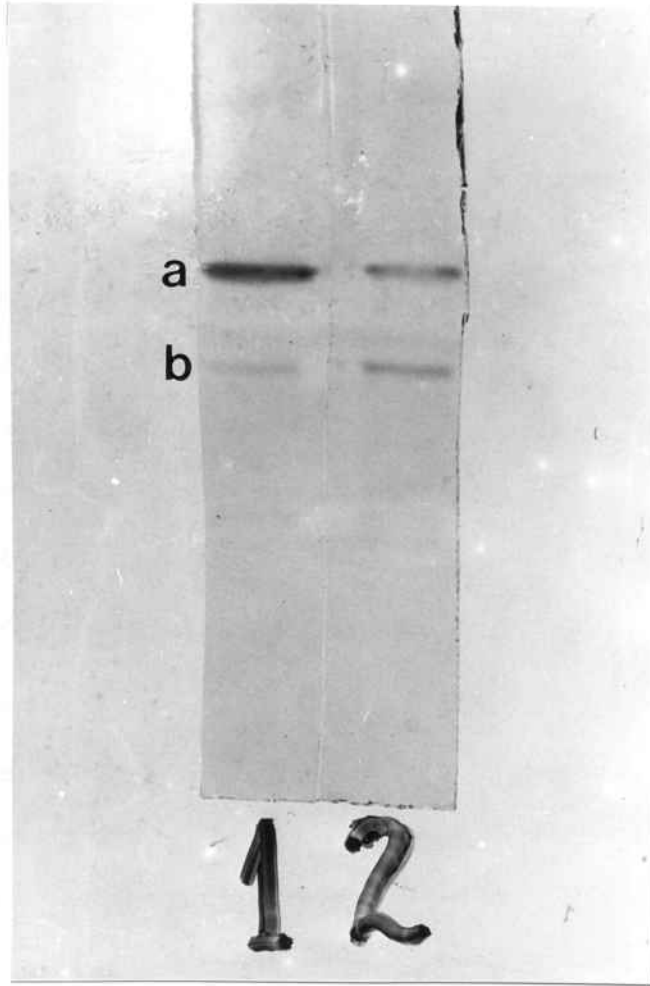


FIGURA 1.- REVELADO POR ACTIVIDAD GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA DE UN EXTRAC-  
TO CELULAR DE LA CEPA EG3 DESPUES DE UNA ELECTRO-  
FORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La cepa EG3 había crecido aerobícamente  
en hidrolizado de caseína.

Se aplicaban muestras del orden de 200  $\mu$ g. de pro-  
teína.

Revelado por actividad GlDH(1) y LaL DH(2)



cuando en la mezcla de revelado no se añadía ningún tipo de sustrato, por lo que se cree que corresponde a una proteína no específica, que participa en la reacción redox a expensas de grupos sulfhidrilo capaces de reducir el NAD sin la presencia de sustrato. Este tipo de artefactos observados en la tinción de proteínas por NBT y PMS está descrito en la literatura (67).

También se procedió a medir las actividades glicolaldehído deshidrogenasa (2.4.2.1.) y lactaldehído deshidrogenasa (2.4.2.2.) en los extractos celulares de la cepa 40, la cual está descrito que carece de actividad lactaldehído deshidrogenasa (65). Los resultados obtenidos mostraron que los valores para ambas actividades eran nulos.

Así mismo, al someter el extracto celular de dicha cepa a una separación electroforética en condiciones no desnaturizantes y revelada posteriormente por actividad glicolaldehído deshidrogenasa y lactaldehído deshidrogenasa, se observaba en ambos casos la ausencia de la misma banda que se correspondía con la banda "a" de la figura 1.

Estos resultados parecen indicar que posiblemente ambas actividades se corresponden con un sólo enzima.

## 3.2. PURIFICACION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

Todo el proceso de purificación era llevado a cabo a una temperatura de 0-4°C.

### 3.2.1. PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO AMONICO.

Al extracto celular obtenido tal como se indica en el apartado 2.3. se le añadía un volumen igual de una solución de sulfato amónico saturado (ajustada a pH 7) a fin de obtener una saturación del 50% (15). La adición de ésta solución se hacía muy lentamente, manteniendo el extracto celular a 0°C (en baño de hielo) y en constante agitación. Finalizada la misma se dejaba en agitación durante 20 minutos y seguidamente se centrifugaba a 30.000 x g. durante otros 20 minutos.

A la fracción sobrenadante, en donde se encontraba la actividad glicolaldehido deshidrogenasa, se le añadía de nuevo un volumen igual de una solución de sulfato amónico saturada (ajustada a pH 7) a fin de conseguir una saturación del 75% (15). La adición se realizaba tal como se ha descrito en el párrafo anterior. Posteriormente, se dejaba en agitación durante 20 minutos y se centrifugaba a 30.000 x g. durante 30 minutos, descartándose a continuación la fracción sobrenadante.

La fracción de proteína precipitada se resuspendía en solución amortiguadora de pH fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 en un volumen aproximado entre 6-8 ml.

A continuación, se procedía a dializar la muestra

contra 25 volúmenes durante una noche, frente a una solución fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,3 a fin de eliminar el exceso de sulfato amónico presente en la muestra.

Es interesante resaltar el hecho de que el enzima fue sometido también a una precipitación por ácido, añadiendo a la muestra en cuestión ácido clorhídrico 0,5 N hasta pH 5,0. Cuando este procedimiento se realizaba después de la precipitación por salado no resultaba efectivo, pues la actividad glicolaldehido deshidrogenasa se encontraba en el precipitado junto a la mayoría de las proteínas. Sin embargo, cuando era el extracto celular el que se sometía a este tratamiento ácido, la actividad glicolaldehido deshidrogenasa se recuperaba totalmente en el sobrenadante, habiendo eliminado una cantidad de proteína considerable. Intentos de purificar al enzima en este sentido mostraron que el procedimiento no era eficaz debido a la poca repetitividad del método.

### 3.2.2. CROMATOGRAFIAS DE INTERCAMBIO IONICO.

A lo largo de la realización de este trabajo se han probado dos tipos de cromatografías de intercambio iónico: una en DEAE-sephadex (intercambiador de aniones) y la otra en carboximetil-celulosa (intercambiador de cationes).

La fracción correspondiente a la precipitación fraccionada con sulfato amónico y posteriormente dializada, tal como se indica en el apartado anterior, se introducía en una co-

lumna de DEAE-sephadex (3 x 12 cm) equilibrada con solución amortiguadora de pH fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. Seguidamente se lavaba la columna con la misma solución hasta que ya no eluía proteína. Con ello se conseguía eliminar aquellas proteínas que no habían sido fijadas a la matriz. A continuación, se aplicaba un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 500 mM en 500 ml de la misma solución amortiguadora de pH. El flujo de equilibración, lavado y elución fue de  $8,5 \text{ ml} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ . En las fracciones colectadas (8 ml.) se ensayaba la actividad glicolaldehido deshidrogenasa.

En la figura 2, se muestra el perfil típico de elución del proceso de cromatografía de intercambio iónico. Como puede observarse, la glicolaldehido deshidrogenasa eluía a una concentración de NaCl de aproximadamente 260 mM.

Las fracciones con mayor actividad glicolaldehido deshidrogenasa se reunieron y concentraron (unas 10-15 veces) por ultrafiltración, resultando un volumen aproximado de 2-3 ml., en un concentrador Amicón, empleando una membrana del tipo PM-10.

Posteriormente, la solución de proteína se dializó exhaustivamente frente a la solución amortiguadora de pH fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3, a fin de eliminar el NaCl procedente del gradiente y que podría interferir en el próximo paso de la purificación.

Como alternativa, se estudió la posibilidad de utilizar intercambiadores catiónicos como la carboximetil-celulosa para ver si su rendimiento era mejor.

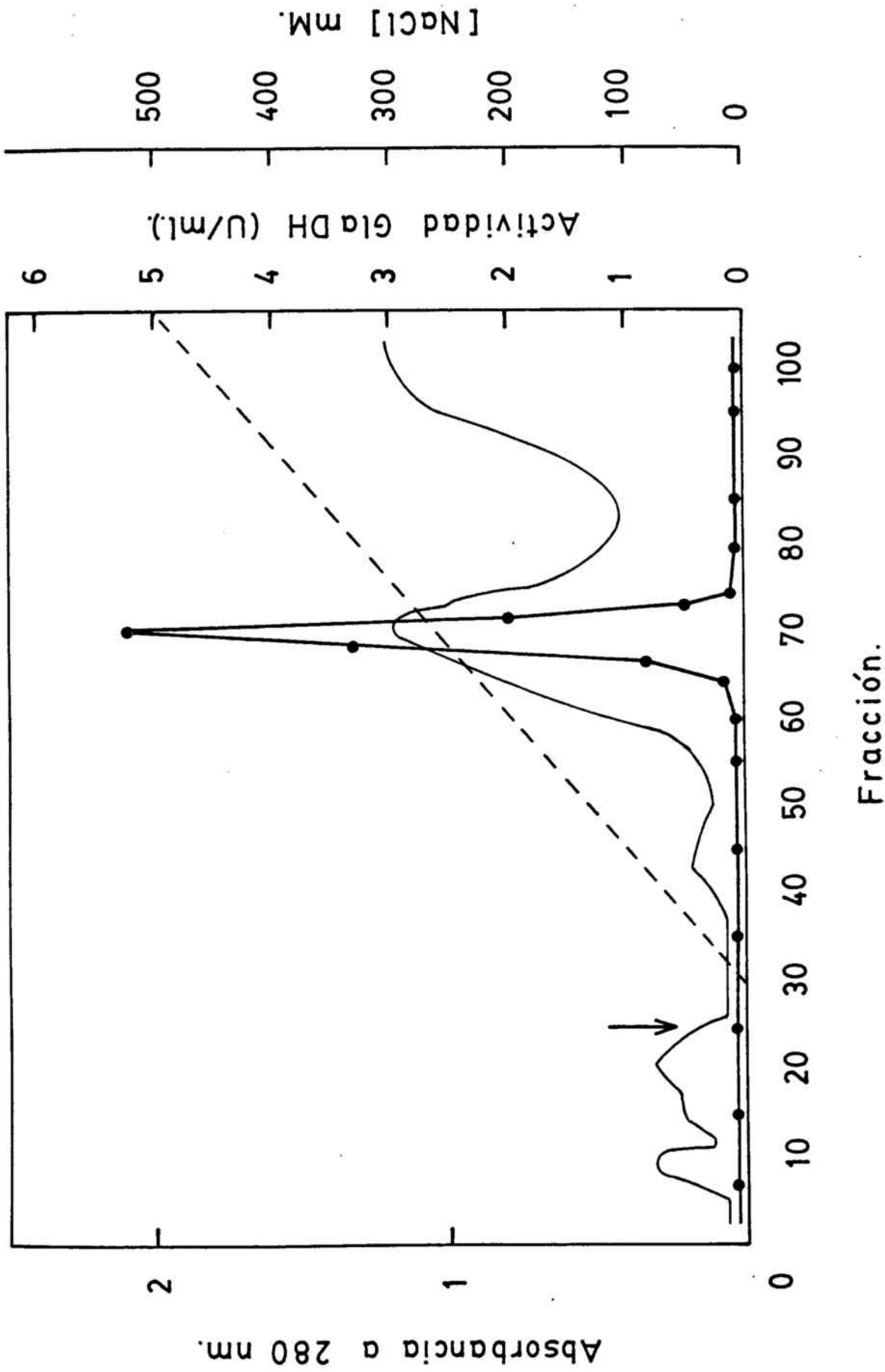
FIGURA 2.- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHADEX.

Esta cromatografía se desarrolló tal como se indica en el texto (apartado 3.2.2.).

La elución de proteína se seguía por medición de la absorbancia a 280 nm. (—).

En las fracciones recogidas, se ensayaba la actividad glicolaldehído deshidrogenasa (GlaDH) (●).

En las fracciones del gradiente, se determinó la concentración de NaCl (---).





La primera modificación que debía introducirse en este caso era la de cambiar el pH de la solución, ya que era necesario que la proteína responsable de la actividad glicolaldehído deshidrogenasa estuviera cargada positivamente a fin de poderse unir a la matriz cromatográfica intercambiadora de cationes. Para ello, en un principio se intentó encontrar aquel pH ácido que con el tiempo afectara lo menos posible a la actividad enzimática. Por consiguiente, una misma muestra fue sometida a varios pH (7,3 que actuaba de control, 6, 5 y 4) y ensayada su actividad glicolaldehído deshidrogenasa a diferentes tiempos durante 24 horas. Los resultados obtenidos mostraron que a pH 5 y a pH 6 se perdía aproximadamente un 15% de la actividad enzimática glicolaldehído deshidrogenasa en 24 horas respecto al control. A pH 4 la pérdida de actividad se correspondía con un 30%. A la vista de estos datos se escogió el pH 5.

Se obtuvo un extracto celular de la cepa EG3 en tampón citrato sódico 10 mM pH 5. 2 ml del mismo se aplicaron a una columna de carboximetil-celulosa CM-32 (whatman) de 2 x 5 cm., equilibrada con solución citrato sódico 10 mM pH5. Se lavó la columna con la misma solución amortiguadora de pH hasta que ya no eluía proteína. Antes de aplicar cualquier tipo de gradiente, se procedió a determinar la actividad enzimática glicolaldehído deshidrogenasa en las fracciones de lavado (2,3 ml.), observándose que toda la actividad aplicada a la columna se recuperaba en las mismas, lo cual indicaba que el enzima no se había fijado a la matriz, siendo recogido con la mayoría de las proteínas del extracto celular.

Este resultado nos llevó a abandonar la idea de em-

plear este +

de la glic

ser efectivo a pH inferior a 5, la inactivación del enzima en estas condiciones no parecía aconsejable.

### 3.2.3. CROMATOGRAFIAS DE AFINIDAD.

En busca de un proceso de purificación idóneo para la glicolaldehído deshidrogenasa, se probaron dos tipos de cromatografía de afinidad: 1) una en Afi-gel blue (Bio-rad) que consta de una matriz de agarosa a la que está unido covalentemente un grupo cromóforo que se asemeja a los nucleótidos de la adenina 2) cromatografía en AGNAD tipo 1 (P.L. Biochemicals) que consta también de una matriz de agarosa que lleva incorporados grupos de NAD mediante enlaces no bien definidos.

Por las características de las mismas, estas matrices cromatográficas son capaces de unir deshidrogenasas dependientes de NAD con un cierto grado de especificidad.

#### 3.2.3.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AFI-GEL BLUE.

Las fracciones con mayor actividad glicolaldehído deshidrogenasa que procedían de un DEAE-sephadex equilibrado, lavado y eluido con solución amortiguadora de pH tris-HCl 10 mM, pH 7,3, se reunieron y dializaron frente al mismo tampón a fin de eliminar el NaCl procedente del gradiente. Una alícuota del dializado se aplicó a una columna de Afi-gel blue de 2 x 4 cm. equilibrada con solución amortiguadora tris-HCl 10 mM pH 7,3.

A continuación, se procedió a lavar la columna con la misma solución amortiguadora, a fin de eliminar la proteína no fijada. El flujo de equilibrado y lavado fue de  $4,8 \text{ ml.} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ . Se ensayó la actividad glicolaldehído deshidrogenasa en las fracciones de lavado obteniéndose en las mismas, aproximadamente la cuarta parte de la actividad aplicada a la columna. Por ello, se procedió a la elución aplicando un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 1M en 60 ml del mismo tampón de equilibrado y lavado de la columna, no recuperándose actividad en ninguna de las fracciones del mismo. Por consiguiente, se intentó la elución del enzima mediante la aplicación de 2M NaCl y posteriormente 10 mM NAD, siendo el resultado negativo en ambos casos. Por todo lo cual se concluyó que el enzima glicolaldehído deshidrogenasa no se unía a este tipo de cromatografía de afinidad bajo estas condiciones.

Como está descrito que la unión de las proteínas a este tipo de matrices depende de varias condiciones (pH, fuerza iónica, etc.) (55) se realizaron dos pruebas, una a pH 6,5 y otra a pH 8,0 a fin de conseguir que la glicolaldehído deshidrogenasa se uniera a la matriz cromatográfica. La muestra y la columna fueron sometidas a estas nuevas condiciones de pH y el resultado obtenido en ambos casos fue igual al anterior: la actividad glicolaldehído deshidrogenasa se recuperaba en las fracciones de lavado de la columna y sólo una cuarta parte de la actividad total.

La inactivación observada en este paso se podría explicar por la ausencia de EDTA y mercaptoetanol en la solución amortiguadora de pH usada en el mismo.

### 3.2.3.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AGNAD TIPO 1.

Dada la imposibilidad de utilizar la cromatografía de afinidad en afi-gel blue, se estudió el empleo de otra matriz de afinidad para deshidrogenasas como es agarosa-NAD (AGNAD tipo 1).

Las fracciones con mayor actividad glicolaldehido deshidrogenasa eluidas de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex reunidas, concentradas y dializadas tal como se indica en el apartado 3.2.2. fueron aplicadas a una columna de AGNAD de 2 x 2 cm., equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. A continuación, se lavó la columna con la misma solución amortiguadora de pH, hasta que no eluía proteína. Posteriormente, se aplicó un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 1M en 30 ml. de la misma solución amortiguadora de pH. El flujo de equilibración, lavado y elución fue de  $4,8 \text{ ml.} \times \text{cm.}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ . Se recogieron fracciones de 2,5 ml. y se ensayó en ellas la actividad glicolaldehido deshidrogenasa. En la figura 3 se muestra el perfil de elución obtenido en este proceso. Como puede observarse, la glicolaldehido deshidrogenasa eluía a una concentración de NaCl de aproximadamente 400 mM.

Con esta técnica de elución inespecífica (por fuerza iónica) se conseguía del orden de unas 18-20 veces de purificación en relación al extracto celular de la cepa EG3.

Puesto que está descrito que las técnicas de elución específicas (por el empleo de cofactores, de cofactor y sustra-

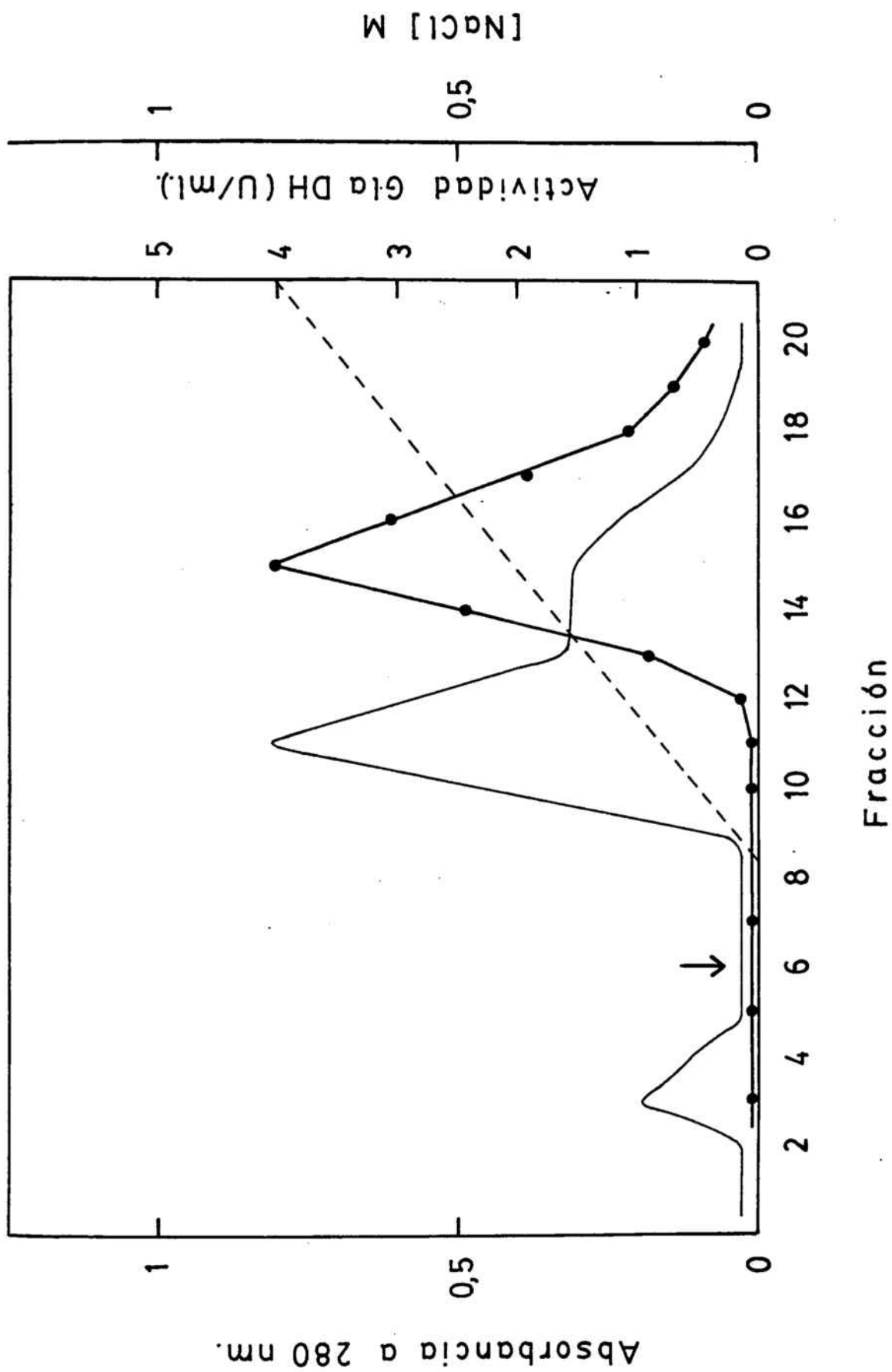
FIGURA 3.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AGAROSA-NAD CON  
ELUCION INESPECIFICA POR GRADIENTE DE NaCl.

El desarrollo de esta cromatografía se detalla en el apartado 3.2.3.2.

La elución de proteína se seguía por medición de la absorbancia a 280 nm. (—).

En las fracciones recogidas, se ensayaba la actividad glicolaldehído deshidrogenasa (GlaDH) (●).

En las fracciones del gradiente, se determinó la concentración de NaCl (---).



to a la vez, de análogos de cofactores, etc.) son más efectivas en este tipo de cromatografías de afinidad (45,46), se pensó en eluir la actividad glicolaldehido deshidrogenasa fijada a la matriz de agarosa-NAD por la aplicación de un gradiente lineal de cofactor.

Así, en este nuevo experimento, se procedió a aplicar la misma muestra que en el caso anterior a la misma columna de AGNAD equilibrada con solución amortiguadora de pH fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. Las condiciones de flujo y lavado de la columna fueron iguales a las descritas anteriormente. Sin embargo, se procedió a eluir la actividad glicolaldehido deshidrogenasa por el empleo de un gradiente lineal de cofactor (NAD) entre 0 y 15 mM en 30 ml de la misma solución amortiguadora de pH, ajustándola a pH 7,3 con NaOH 0,1 N después de la adición del cofactor. Se recogieron también fracciones de 2,5 ml. y se determinó en ellas la actividad glicolaldehido deshidrogenasa. En la figura 4 se muestra el perfil de elución obtenido en este proceso.

Con este tipo de elución específica se conseguía aumentar considerablemente la actividad específica en este paso, obteniendo alrededor de unas 45 veces de purificación en relación al extracto celular de la cepa EG3.

A la vista de los resultados se llevó a cabo habitualmente la elución específica por gradiente de NAD en este proceso de cromatografía de afinidad en la purificación del enzima glicolaldehido deshidrogenasa.

FIGURA 4.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AGAROSA-NAD CON ELUCION ESPECIFICA POR GRADIENTE DE NAD.

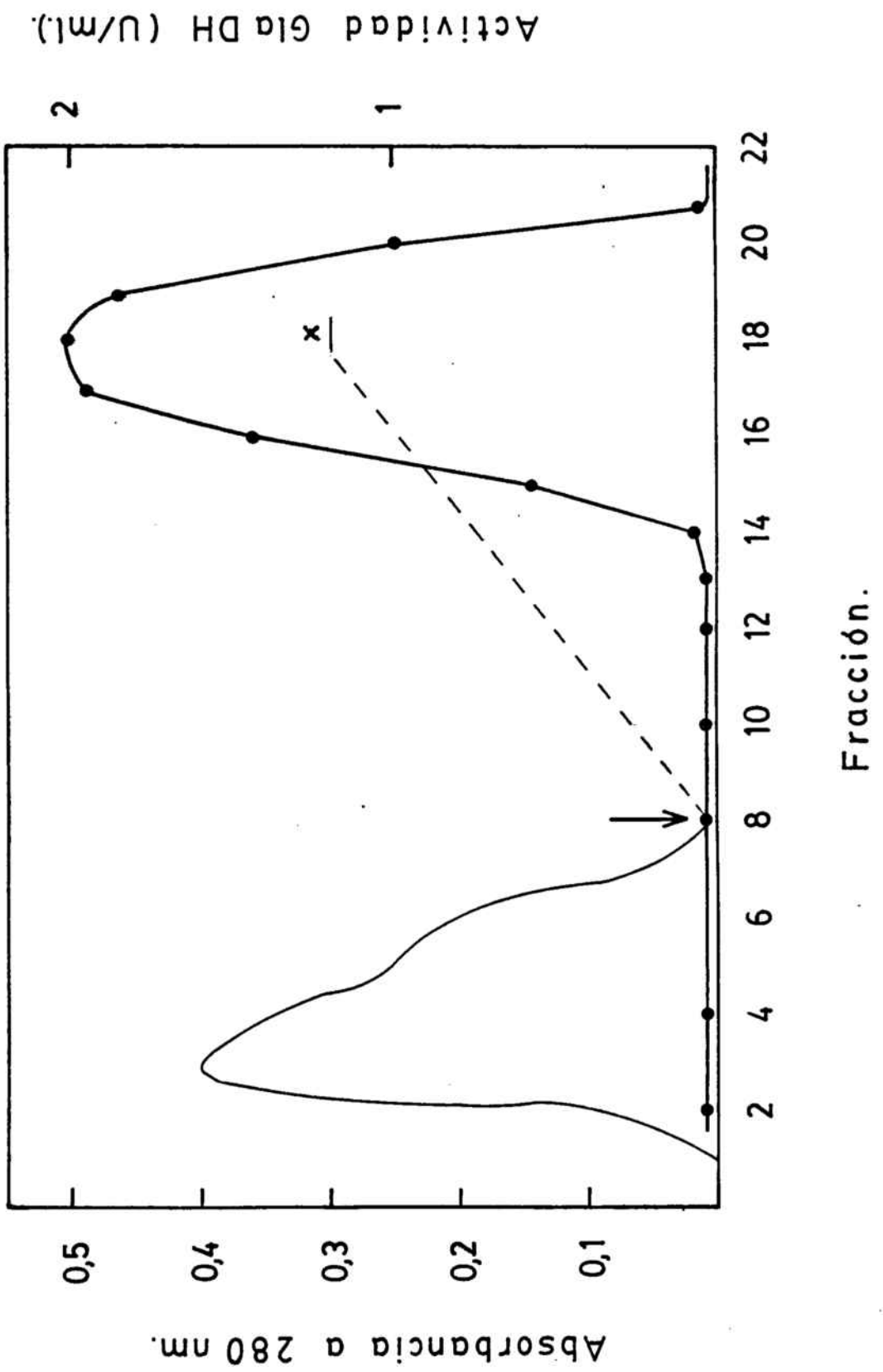
Esta cromatografía se desarrolló según se indica en el texto (apartado 3.2.3.2.)

En las fracciones recogidas, se ensayaba la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (GlaDH) (•).

En las fracciones de lavado, la elución de proteína se seguía por medición de la absorbancia a 280 nm, (—), sin embargo en las fracciones correspondientes al gradiente, no fue posible practicar esta determinación, por interferencia del NAD presente en las mismas.

---X : la concentración media de proteína de las fracciones de mayor actividad glicolaldehido deshidrogenasa según el método de Lowry era de 0,15 mg/ml.





### 3.2.4. CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACION EN ULTROGEL ACA-34.

Las fracciones más activas que eluían de la columna de afinidad por la aplicación de un gradiente lineal de NAD, se reunían y concentraban por ultrafiltración hasta un volumen de 1-2 ml en un concentrador Amicon, usando una membrana del tipo PM-10.

A continuación, la solución protéica se aplicaba a una columna de ultrogel ACA-34 (1,5 x 94 cm.) equilibrada y eluida con solución amortiguadora de pH fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 (flujo  $7 \text{ ml.} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ ). Se recogían fracciones de 2 ml. y se ensayaba en ellas la actividad glicolaldehido deshidrogenasa. En la figura 5 se observa el perfil de elución de esta cromatografía de gel filtración.

Las fracciones con mayor actividad glicolaldehido deshidrogenasa se reunían y posteriormente se concentraban por ultrafiltración hasta un volumen de 1 ml. en un concentrador Amicon, usando una membrana del tipo PM-10. Seguidamente, esta solución de proteína se repartía en alicuotas de 100  $\mu\text{l.}$ , que eran conservadas a  $-40^{\circ}\text{C.}$

En la tabla 2 se muestran los resultados del proceso de purificación del enzima glicolaldehido deshidrogenasa.

Es interesante resaltar que cuando se realizaban cromatografías de gel filtración equilibradas y eluidas con solución tris-HCl 10 mM, pH 7,3, la actividad glicolaldehido deshidrogenasa salía excluida (ultrogel ACA-44: límite de ex-

FIGURA 5.- CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACION EN ULTROGEL ACA-34.

Esta cromatografía se desarrolló según se indica en el texto (apartado 3.2.4.)

En las fracciones recogidas, se ensayaba la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (GlaDH) ( • ).

La elución de proteína se seguía por medición de la absorbancia a 280 nm. (—).

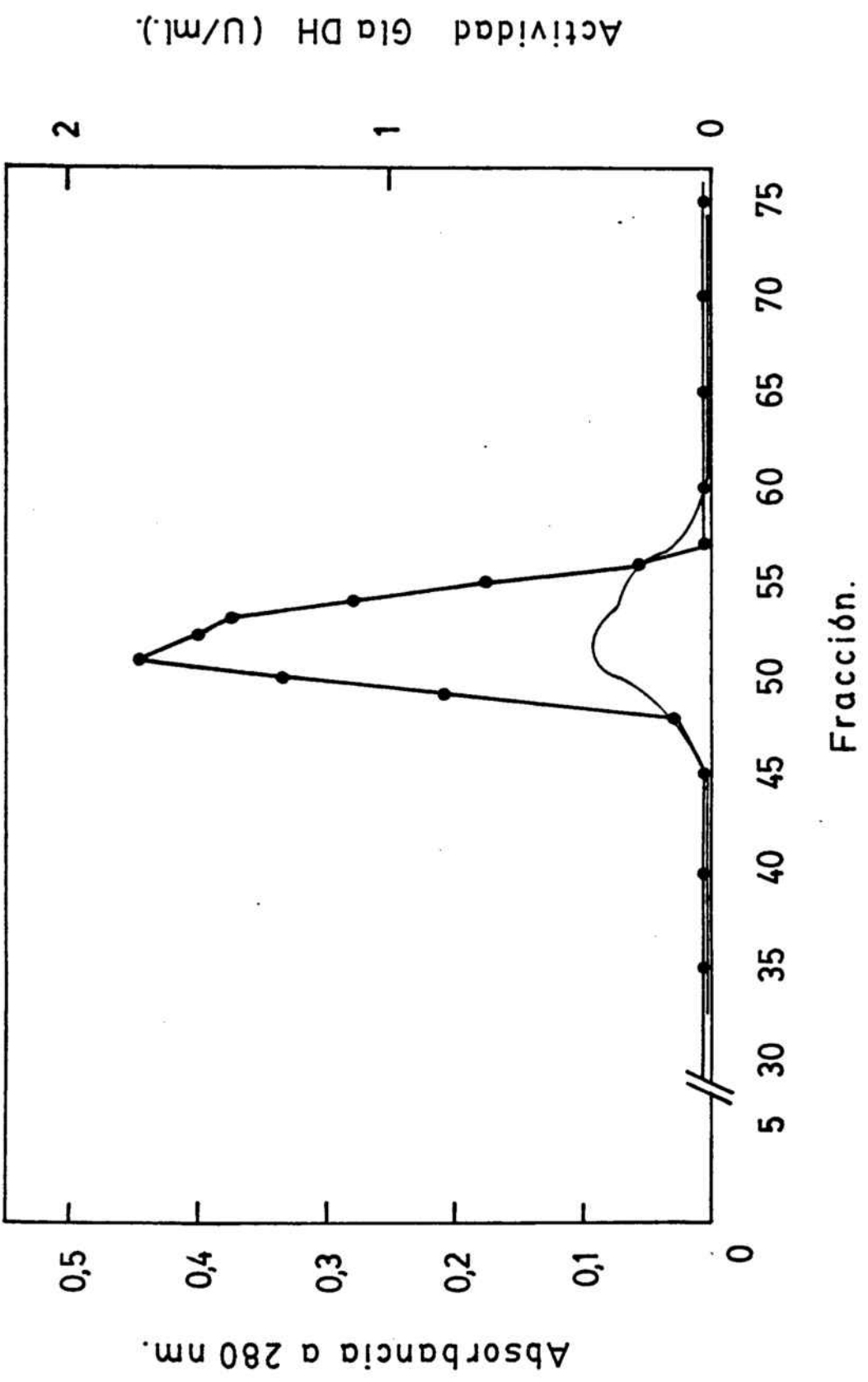


TABLA 2

PURIFICACION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA DE CEPA EG3.

	Proteína (mg)	Actividad específica (unidades/mg proteína)	Purificación veces	Rendimiento (%)
Extracto celular	768,00	0,35	1,0	100,0
Sulfato amónico (50-75%)	209,00	0,93	2,7	71,4
DEAE-sephadex	34,50	3,97	11,3	50,0
AGNAD eluido con NAD	4,32	16,07	45,0	25,3
Ultrogel ACA-34	1,03	30,54	87,0	11,4

clusión 130.000 daltons), o bien muy próxima al volumen de exclusión ( $V_0$ ) (ultrogel ACA-34: límite de exclusión 350.000 daltons y Biogel A-0,5: límite de exclusión 500.000 daltons), indicando con ello que su peso molecular era, no sólo muy elevado, sino que además los resultados no parecían congruentes, pues este enzima presentaba movilidad en un gel de poliacrilamida al 10%, cuya malla no permite el paso de proteínas de peso molecular superior a 200.000-250.000 daltons.

Puesto que cabía la posibilidad de que el elevado peso molecular observado fuera debido a una agregación del enzima durante el proceso de purificación, este tipo de cromatografía de gel filtración se realizó con muestras procedentes de todos los pasos de la purificación: extracto celular, la fracción correspondiente a la precipitación con sulfato amónico y las fracciones procedentes de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex, siendo el resultado idéntico en todos los casos.

Asimismo, y teniendo en cuenta una posible agregación del enzima como consecuencia de los ultrasonidos en el proceso de obtención del extracto celular, se procedió a comprobar si la disrupción celular por métodos mecánicos con perlas de vidrio ofrecía resultados diferentes. Para ello, una suspensión celular de E.coli, obtenida con solución tris-HCl 10 mM, pH 7,3, en un volumen dos veces superior al peso húmedo de las células recogidas por centrifugación, se mezcló con bolas de vidrio (ballotini nº12) en la proporción 3:2 y se sometió a agitación en un homogeneizador Virtis por espacio de 3 minutos/25 ml susp.

El extracto celular así obtenido fue sometido también

a una cromatografía de gel filtración, observando que el enzima glicolaldehido deshidrogenasa presente en el mismo se comportaba igual que el enzima del extracto celular obtenido mediante ultrasonidos.

A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta que la lactaldehido deshidrogenasa (enzima muy similar a la glicolaldehido deshidrogenasa) era purificado usando la solución fosfato sódico 10 mM (65), se procedió a realizar el siguiente experimento:

Se empaquetó una columna cilíndrica con ultrogel ACA-34 (límite de exclusión 350.000 daltons) cuyas medidas eran 1,5 x 64 cm., equilibrada con tampón tris-HCl 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. Se determinó el  $V_0$  (volumen del espacio entre las partículas del gel) midiendo el volumen de elución de una solución de azul dextrano 2000 que es incapaz de penetrar en la matriz debido a su elevado peso molecular (59), resultando ser de 46,2 ml. Trás lavar la columna y equilibrarla con la misma solución amortiguadora de pH, se aplicó 1 ml de un extracto celular de la cepa EG3 obtenido con tampón tris-HCl 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. El perfil de elución de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa en estas condiciones se muestra en la figura 6 (pico I). El volumen de elución del enzima fue de 56,1 ml.

A continuación, la misma columna se equilibró con solución fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3. De nuevo se calculó el  $V_0$  resultando idéntico al calculado anteriormente. Posteriormente, se aplicó a la columna 1 ml de un extracto celular de la cepa EG3 obtenido con el tampón de

FIGURA 6.- COMPORTAMIENTO DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA EN UNA GEL FILTRACION EN PRESENCIA DE SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS O DE TRIS.

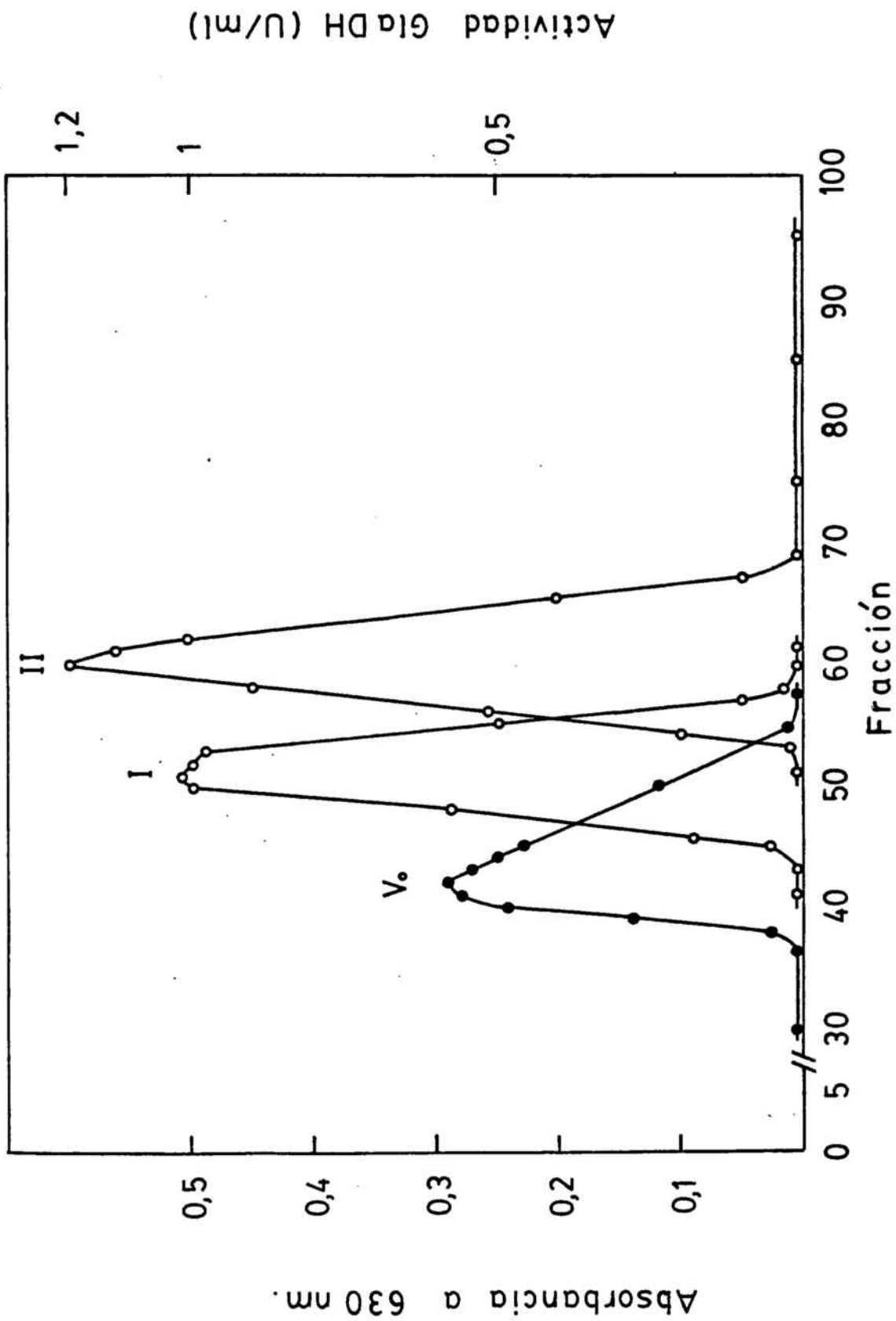
Este experimento se efectuó tal como se indica en el texto (apartado 3.2.4.).

La determinación del  $V_0$  se efectuó por medición del volumen de elución de una solución de azul dextrano 2000, que absorbe a 630 nm. (●).

En las fracciones recogidas, se ensayaba la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (GlaDH) (○).

- PICO I: volumen de elución del enzima glicolaldehido deshidrogenasa en presencia de solución amortiguadora de pH tris-HCl.
- PICO II: volumen de elución del enzima glicolaldehido deshidrogenasa en presencia de solución amortiguadora de pH fosfatos.





equilibración (fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3) y eluida del mismo modo. El perfil de actividad glicolaldehido deshidrogenasa en estas nuevas condiciones, se muestra en la figura 6 (pico II). El volumen de elución del enzima fue de 66 ml.

En todas las separaciones cromatográficas de este experimento el flujo de la columna era de  $10 \text{ ml.} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ , y el volumen de las fracciones recogidas de 1,1 ml.

Como muestra claramente la figura 6, el perfil de elución de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa es distinto según el tipo de solución amortiguadora de pH utilizada. La relación  $V_e/V_0$  para el enzima glicolaldehido deshidrogenasa era de 1,21 en el caso de la solución tris-HCl, y de 1,43 en el caso de la solución fosfato sódico.

A la vista de estos resultados se escogió como tampón de purificación el de fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3.

### 3.2.5. CRITERIOS DE HOMOGENEIDAD.

10, 20, 30 y 40  $\mu\text{g}$ . de proteína de la solución proteica obtenida al mezclar las fracciones de mayor actividad glicolaldehido deshidrogenasa eluidas con un gradiente de NAD de la columna de afinidad de agarosa-NAD (apartado 3.2.3.2.) fueron sometidos respectivamente a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5%, revelándose posteriormente con azul brillante de Coomassie. Si bien con 10  $\mu\text{g}$ . de proteína

se apreciaba una única banda, con 20, 30 y 40  $\mu\text{g}$ . de proteína aparecían algunas más, de menor intensidad (figura 7), lo que indicaba que la glicolaldehido deshidrogenasa no estaba purificada a homogeneidad en este paso.

Paralelamente, se aplicaron 70  $\mu\text{g}$ . de proteína de la misma solución protéica a esta misma separación electroforética para ser revelados por actividad glicolaldehido deshidrogenasa, observándose una única banda que mostraba una movilidad electroforética idéntica a la banda "a" del extracto celular de la cepa EG3 descrita en el apartado 3.1 y que coincidía con la banda de mayor intensidad observada al revelar por proteína.

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de 10-20  $\mu\text{g}$ . de glicolaldehido deshidrogenasa purificada (de las fracciones correspondientes al ultrogel ACA-34) mostraba una banda mayoritaria y un contaminante, trás revelar con azul brillante de Coomassie (Figura 8). Cuando se aplicaban del orden de 50  $\mu\text{g}$ . o más, no aparecían más bandas que las dos ya descritas y curiosamente la banda de menor intensidad no aparecía más visible a pesar de poner mayor cantidad de proteína.

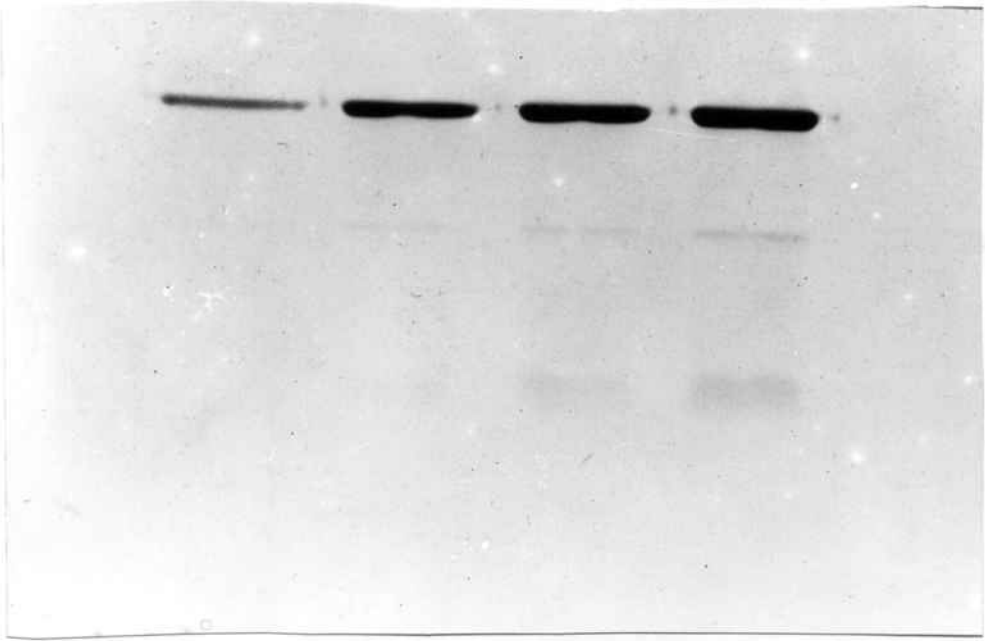
### 3.2.6. ESTABILIDAD.

Uno de los grandes inconvenientes en la manipulación de la glicolaldehido deshidrogenasa era su marcada inestabilidad, hecho que se pone de manifiesto en el relativamente bajo rendimiento obtenido en el proceso de purificación (tabla 2).

En una muestra inactivada eluida de una cromatogra-

FIGURA 7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA PROCEDENTE DE LA CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD (AGNAD) ELUIDA CON UN GRADIENTE DE NAD.

10, 20, 30, 40  $\mu$ g. de la solución protéica, obtenida en este paso del proceso de purificación, fueron aplicados a un gel de electroforesis de poliacrilamida al 7,5%, revelandose posteriormente por tinción con azul brillante de Coomassie.



FIGURE

FIGURA 8.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA PURIFICADA.

10 y 20  $\mu$ g. de glicolaldehido deshidrogenasa purificada se aplicaron a un gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS, revelándose después por tinción de proteínas con azul brillante de Coomassie.

de la galactosidasa, se observó un aumento de actividad en los  
casos de lactosidasa. En los casos de actividad normal, se  
observó un aumento de actividad en los casos de actividad normal.  
En los casos de actividad normal, se observó un aumento de actividad  
normal en los casos de actividad normal.



de la galactosidasa, se observó un aumento de actividad en los  
casos de lactosidasa. En los casos de actividad normal, se  
observó un aumento de actividad en los casos de actividad normal.  
En los casos de actividad normal, se observó un aumento de actividad  
normal en los casos de actividad normal.

de la galactosidasa, se observó un aumento de actividad en los  
casos de lactosidasa. En los casos de actividad normal, se  
observó un aumento de actividad en los casos de actividad normal.  
En los casos de actividad normal, se observó un aumento de actividad  
normal en los casos de actividad normal.

de la galactosidasa, se observó un aumento de actividad en los  
casos de lactosidasa. En los casos de actividad normal, se  
observó un aumento de actividad en los casos de actividad normal.  
En los casos de actividad normal, se observó un aumento de actividad  
normal en los casos de actividad normal.

fía de gel filtración, se procedió a estudiar el efecto de algunos cationes monovalentes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) y divalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) sobre la actividad glicolaldehido deshidrogenasa. Ninguno de los citados producía una activación del enzima cuando estaba presente en la mezcla de ensayo. Sin embargo, el enzima resultaba completamente inactivado en presencia de iones  $Ca$  y  $Mg^{2+}$ , a una concentración de 0,2 M. Por ello, se decidió usar EDTA en los tampones de purificación resultando efectivo a una concentración de 1 mM.

Por otra parte, se obtenía una inactivación considerable cuando la glicolaldehido deshidrogenasa era sometida a procesos de diálisis. Con el empleo de 10 mM 2-mercaptoetanol se solventó este problema, si bien no ofrecía una estabilización total, sino más bien una menor inactivación. Así, con la introducción del 2-mercaptoetanol en el tampón de purificación, la pérdida de actividad glicolaldehido deshidrogenasa en las diálisis era sólo del 10-15%.

Se ha observado también que el enzima es muy inestable cuando está presente en soluciones protéicas de baja concentración. Por consiguiente, después de cada paso de la purificación se procedía a concentrar la solución protéica obtenida, sobretodo si esta debía ser posteriormente dializada.

Las preparaciones purificadas después del AGNAD y del ultrogel ACA-34 se concentraban y guardaban en alicuotas de 100  $\mu$ l. a  $-40^{\circ}C$ . A pesar de ello, se observaba una pérdida de actividad, que en el caso de la muestra procedente del ultrogel ACA-34 era muy marcada (del orden del 90% en 24-48 horas). El estudio de la estabilidad del enzima en este paso está en curso.



### 3.3. ACTIVIDAD DE LA PREPARACION ENZIMATICA PURIFICADA SOBRE OTROS SUSTRATOS.

#### 3.3.1. ACTIVIDAD DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA SOBRE OTROS ALDEHIDOS.

Por estudios realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, se sabía ya , que la glicolaldehido deshidrogenasa era capaz de catalizar la deshidrogenación de otros aldehidos estructuralmente relacionados con el glicolaldehido, en concreto mostraba también actividad sobre el L-lactaldehido y L-gliceraldehido (6) (apartado 1.3.). Estos ensayos de actividad relativa de la glicolaldehido deshidrogenasa sobre otros sustratos fueron realizados en extractos celulares de cepas mutantes etilenglicol positivo, por lo que se creyó de interés repetirlos con la preparación enzimática purificada.

La muestra enzimática que se usó en este tipo de ensayos era la procedente de la cromatografía de afinidad eluida con un gradiente de NAD. Si bien esta preparación no está purificada a homogeneidad, si lo está lo suficiente para este tipo de determinaciones, puesto que cuando es separada electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y revelada posteriormente por actividad glicolaldehido deshidrogenasa sólo aparece una banda (apartado 3.2.5.) indicando que no hay otros enzimas con actividad sobre el glicolaldehido en estas condiciones de ensayo.

No fue posible utilizar la muestra enzimática proce-

dente del ultrogel ACA-34 debido a su alta inestabilidad (apartado 3.2.6.).

Para conocer la actividad relativa de la glicolaldehido deshidrogenasa sobre el glicolaldehido, L-lactaldehido y L-gliceraldehido, se ensayó la actividad glicolaldehido deshidrogenasa según el apartado 2.4.2.1., a distintas concentraciones de cada uno de los sustratos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

En las figuras 9A, 10A y 11A se observa el perfil de la actividad enzimática a varias concentraciones de sustrato para cada uno de los tres aldehidos ensayados. Como puede apreciarse, todos muestran inhibición a elevadas concentraciones de sustrato.

Cuando este ensayo enzimático a varias concentraciones de sustrato se realizó con soluciones de L-lactaldehido, se puso de manifiesto la dimerización descrita para los  $\alpha$ -hidroxialdehidos (43). Puede verse que concentraciones de L-lactaldehido de 0,1 mM y 0,05 mM mostraban una actividad mucho menor y no lineal, en comparación con las determinaciones obtenidas a esas mismas concentraciones de lactaldehido desdimerizado según se indica en el apartado 2.7.4. Con este sustrato previamente tratado pueden llevarse a cabo determinaciones fiables hasta concentraciones tan bajas como 0,02 mM.

### 3.3.2. CALCULO DE LOS VALORES DE $K_m$ Y $V_{max}$ PARA EL GLICOLALDEHIDO, L-LACTALDEHIDO, L-GLICERALDEHIDO.

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . para estos tres aldehidos se

TABLA 3

ACTIVIDAD CRUZADA SOBRE DISTINTOS ALDEHIDOS DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

		ACTIVIDAD a)		
		GLICOLALDEHIDO	DESHIDROGENASA	
Concentración de sustrato ( mM )	Sustrato :	Glicolaldehido	L-lactaldehido	L-gliceraldehido
4		8,51	-	5,67
2		9,45	-	7,56
1		9,45	2,26	8,03
0,50		7,56	3,21	8,51
0,25		4,72	4,53	7,08
0,10		2,27	5,67	5,20
0,05		1,47	5,67	3,21
0,025		-	3,29	-
0,010		-	2,11	-

a) La actividad glicolaldehido deshidrogenasa ensayada según el apartado 2.4.2.1. y expresada en U/mg de proteína, ha sido determinada en todos los casos en la misma preparación enzimática.

determinaron para el enzima glicolaldehido deshidrogenasa eluido de la cromatografía de afinidad en el proceso de purificación.

Para ello se ensayó la actividad deshidrogenasa del enzima glicolaldehido deshidrogenasa (apartado 2.4.2.1.) en presencia de distintas concentraciones de cada uno de los aldehidos, que en cada caso se indican en el pie de gráfica correspondiente, de manera que una de ellas tuviera un valor similar al de la  $K_m$  y las demás fuesen superiores o inferiores a este valor. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y los valores de actividad hallados se emplearon para calcular graficamente el valor de la  $K_m$  y el de la  $V_{max}$ , según el método de los dobles recíprocos de Lineweaver y Burk (44).

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  obtenidos para los aldehidos ensayados fueron los siguientes :

- Glicolaldehido (figura 9B) :  $K_m$ :  $3,35 \times 10^{-4}$  M  
 $V_{max}$ : 19,58 U/mg de proteína.
- L-lactaldehido (figura 10B) :  $K_m$ :  $2,2 \times 10^{-5}$  M  
 $V_{max}$ : 3,40 U/mg de proteína.
- L-gliceraldehido (figura 11B) :  $K_m$ :  $1,3 \times 10^{-4}$  M  
 $V_{max}$ : 11,10 U/mg de proteína.

## FIGURA 9.-

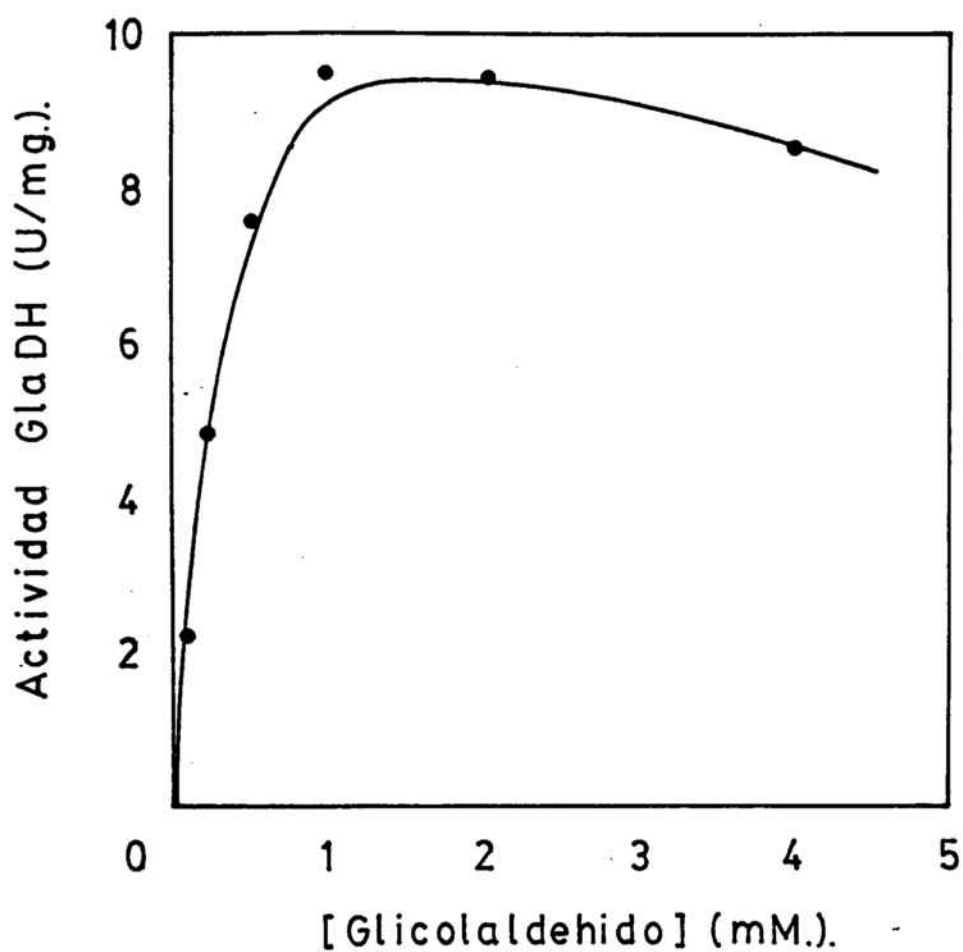
- A) EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLICOLALDEHIDO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

La actividad glicolaldehido deshidrogenasa (GlaDH) se ensayó a diferentes concentraciones de glicolaldehido.

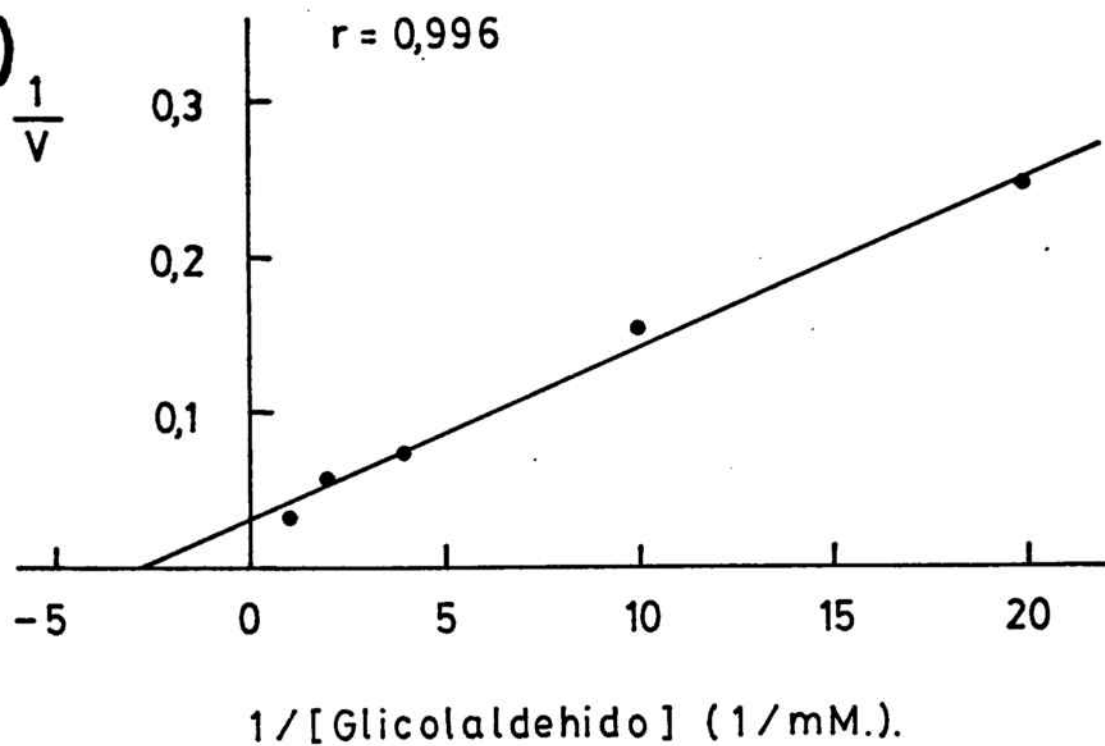
- B) DETERMINACION DE LOS VALORES DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA EL GLICOLALDEHIDO DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA .

Representación, según Lineweaver y Burk, de los inversos del valor de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (en U/ml) frente a los inversos de las siguientes concentraciones de glicolaldehido: 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 y 1 mM.

A)



B)



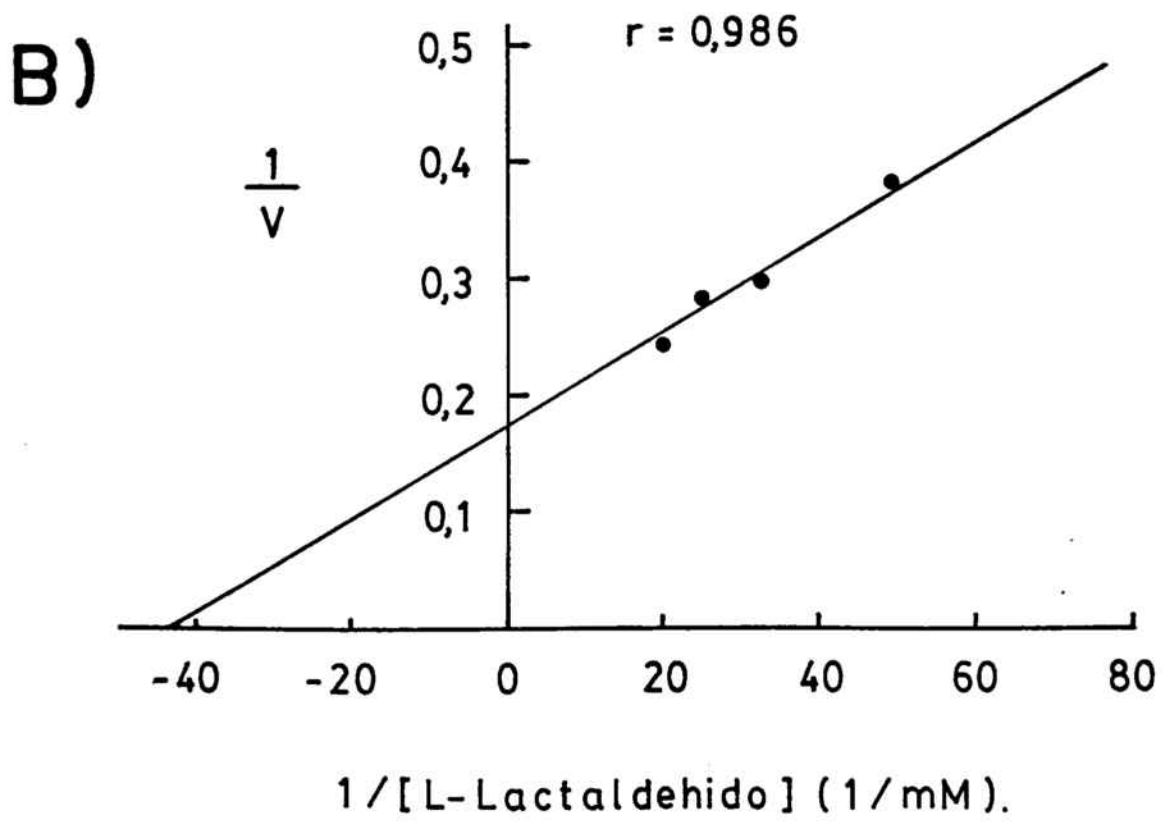
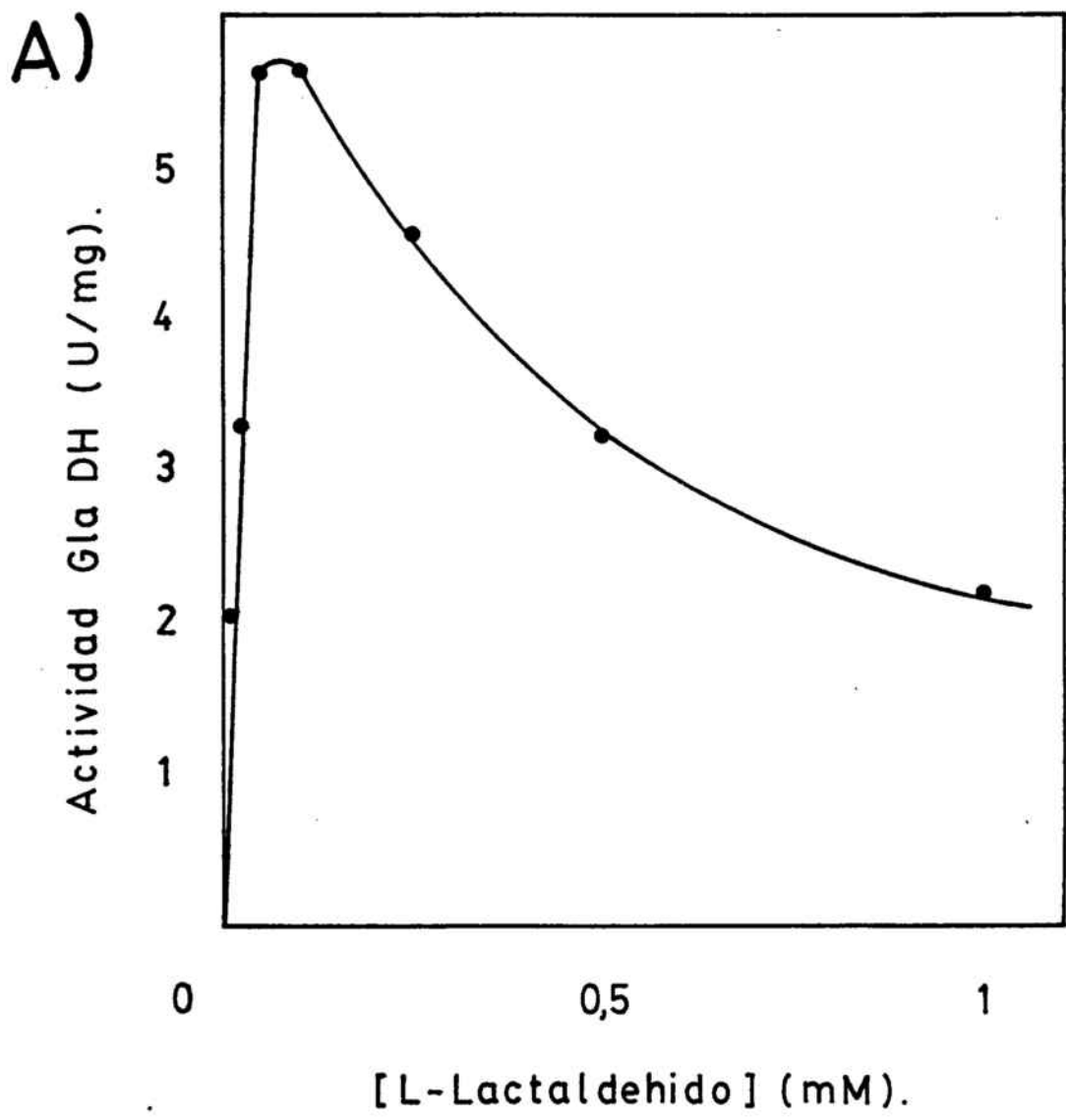
## FIGURA 10.-

- A) EFECTO DE LA CONCENTRACION DE L-LACTALDEHIDO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

La actividad glicolaldehido deshidrogenasa (GlaDH) se ensayó a diferentes concentraciones de L-lactaldehido.

- B) DETERMINACION DE LOS VALORES DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA EL L-LACTALDEHIDO DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

Representación, según Lineweaver y Burk, de los inversos del valor de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (en U/ml) frente a los inversos de las siguientes concentraciones de L-lactaldehido: 0,02 ; 0,03 ; 0,04 y 0,05 mM.





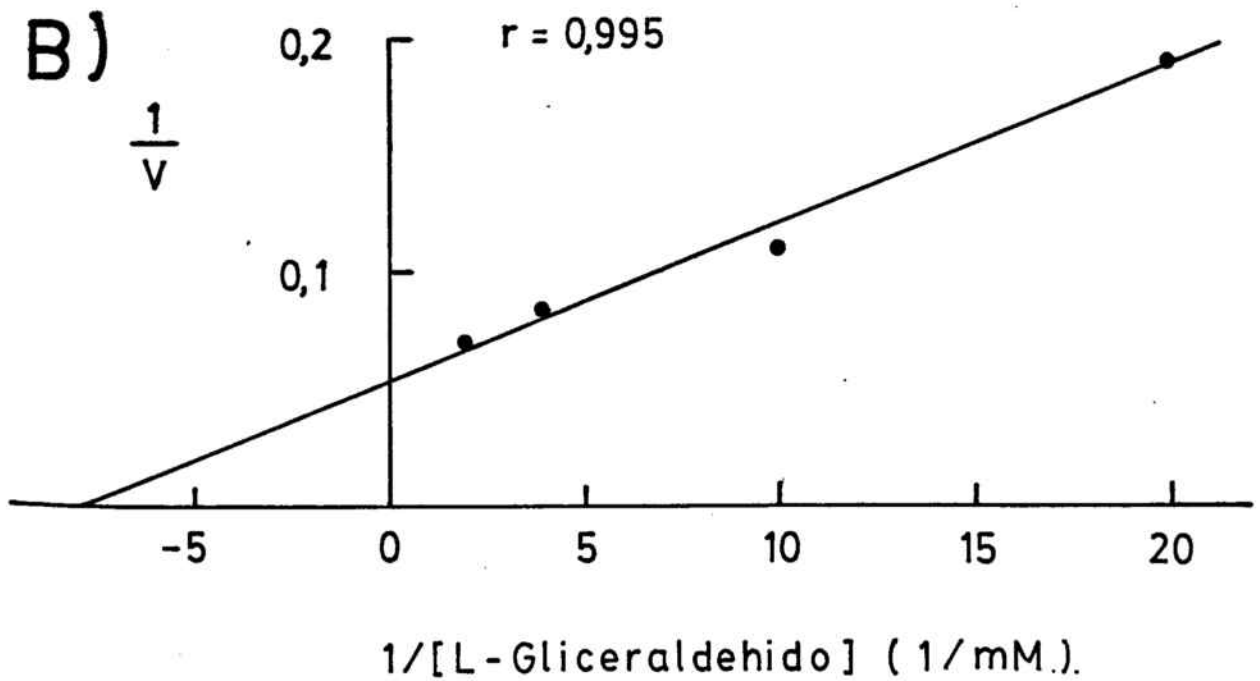
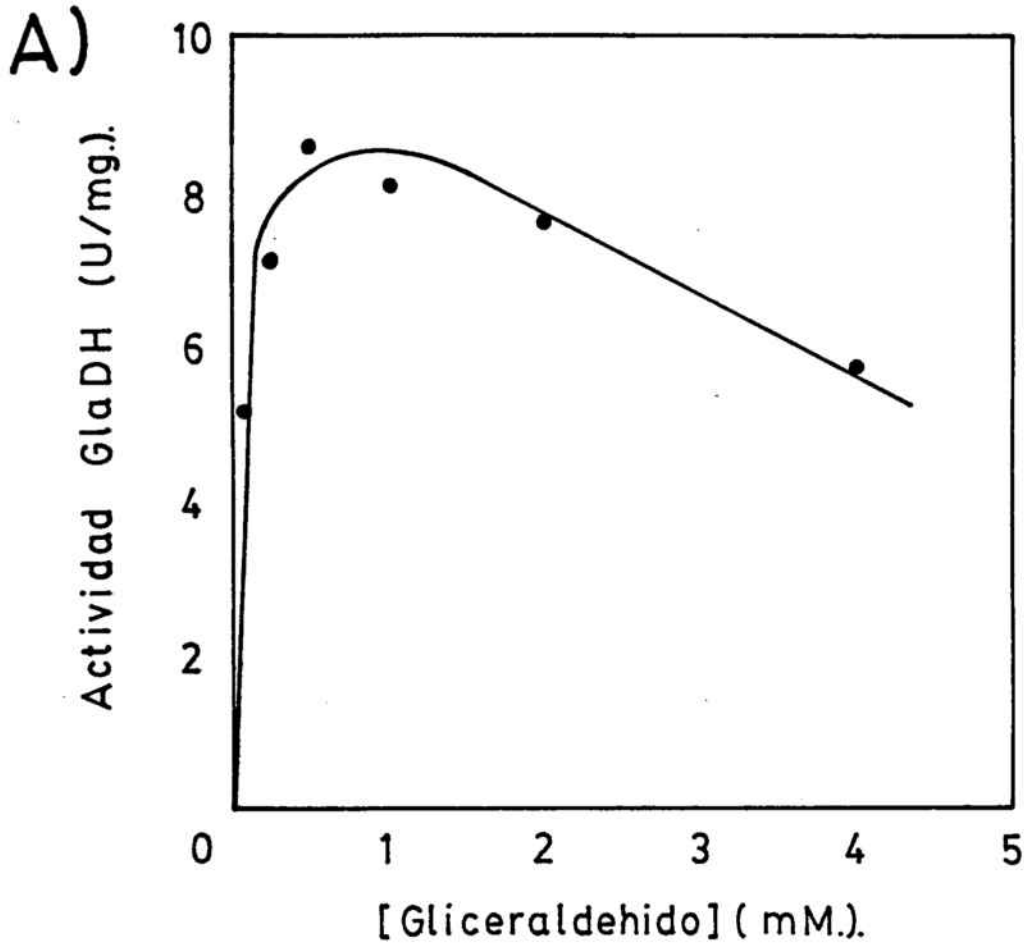
## FIGURA 11.-

- A) EFECTO DE LA CONCENTRACION DE L-GLICERALDEHIDO SOBRE LA VELOCIDAD DE REACCION DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

La actividad glicolaldehido deshidrogenasa (GlaDH) se ensayó a diferentes concentraciones de L-gliceraldehido.

- B) DETERMINACION DE LOS VALORES DE  $K_m$  Y  $V_{max}$  PARA EL L-GLICERALDEHIDO DEL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

Representación, según Lineweaver y Burk, de los inversos del valor de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (en U/ml) frente a los inversos de las siguientes concentraciones de L-gliceraldehido: 0,05 ; 0,1 ; 0,25 y 0,5 mM.



### 3.4. ALGUNOS CRITERIOS SOBRE LA IDENTIDAD ENTRE LA GLICOLALDEHIDO Y LA LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA.

#### 3.4.1. COPURIFICACION DE LAS ACTIVIDADES GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA EN UNA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHADEX.

Una de las primeras pruebas realizadas para poner de manifiesto la posible identidad de los enzimas glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa (apartado 1.6.) fue la de realizar una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex y comprobar la elución conjunta de ambas actividades.

Para ello se obtuvo un extracto celular de la cepa EG3 cultivada en hidrolizado de caseína al 0,5%, tal como se indica en el apartado 2.3., salvo que las células se resuspendían en solución amortiguadora de pH tris-HCl 10 mM, EDTA 2,5 mM ajustada a pH 7,3 y conteniendo 175 mM NaCl. Un volumen de 4 ml de este extracto celular ( 9,3 U/ml de actividad glicolaldehido deshidrogenasa y 4,34 U/ml de actividad lactaldehido deshidrogenasa) se introdujeron en una columna de DEAE-sephadex ( 3 x 12 cm.) previamente equilibrada con la solución tris-HCl 10 mM, EDTA 2,5 mM, NaCl 175 mM, pH 7,3. La columna se lavó con esta misma solución hasta que no eluyó más proteína y a continuación se aplicó un gradiente lineal de NaCl entre 175 mM y 500 mM en 400 ml de la misma solución amortiguadora de pH (el flujo de equilibrio, lavado y elución fue de  $8,5 \text{ ml.} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$ ). En las fracciones recogidas (4,6 ml.), tanto en las de lavado como

en las del gradiente, se ensayaron las actividades glicolaldehído deshidrogenasa y lactaldehído deshidrogenasa (apartados 2.4.2.1. y 2.4.2.2.).

En la figura 12 se puede observar el perfil de elución de proteína junto a los de actividades enzimáticas. Como se puede apreciar, ambos picos de actividad eluyen en idénticas fracciones, coincidiendo ambos máximos de actividad. Ambas actividades eluyen a una concentración aproximada de 320 mM NaCl. No se detectan más picos de actividad en toda la cromatografía.

Por otra parte, tras la cromatografía, se reunieron las fracciones de mayor actividad glicolaldehído deshidrogenasa y lactaldehído deshidrogenasa, recuperándose en 46 ml., 0,74 U/ml de actividad glicolaldehído deshidrogenasa y 0,35 U/ml de actividad lactaldehído deshidrogenasa. Se observó que la relación entre ambas actividades se mantenía constante, siendo de 2,14 en el extracto celular y de 2,12 tras la cromatografía en DEAE-sephadex. Además, la relación entre estas dos actividades en cada una de las fracciones ensayadas oscilaba alrededor de 2,10-2,15. Estos datos apoyan la hipótesis de que las actividades glicolaldehído deshidrogenasa y lactaldehído deshidrogenasa se corresponden con una única proteína.

### 3.4.2. COPURIFICACION DE LAS ACTIVIDADES GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA EN TODO EL PROCESO DE PURIFICACION DISEÑADO PARA EL ENZIMA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA.

Puesto que se había comprobado la copurificación de

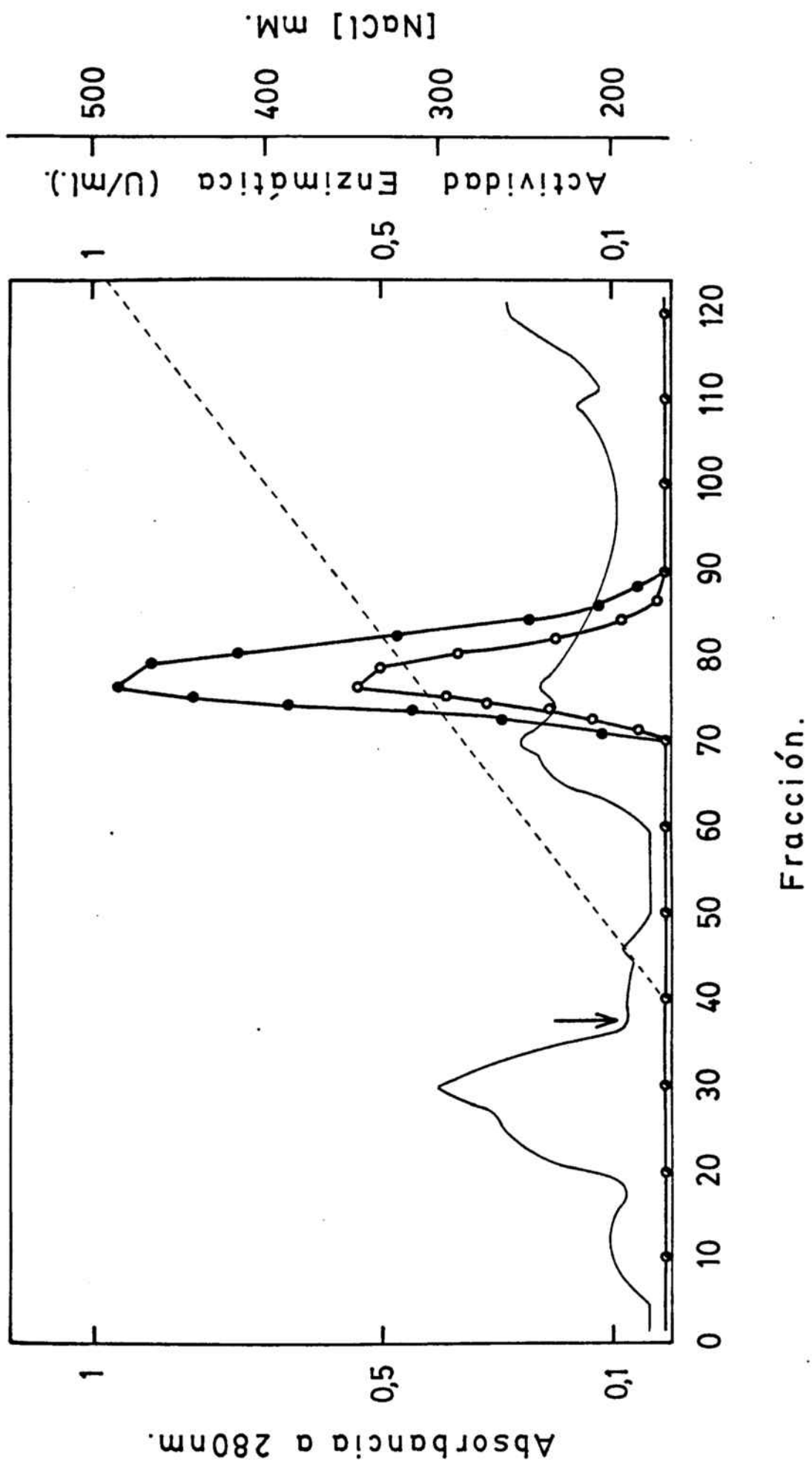
FIGURA 12.- COPURIFICACION DE LAS ACTIVIDADES GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA EN UNA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-SEPHADEX.

El desarrollo de esta cromatografía se efectuó según se indica en el apartado 3.4.1.

La elución de proteína se seguía por medición de absorbancia a 280 nm. (—).

En las fracciones recogidas, se ensayó la actividad glicolaldehido deshidrogenasa (●) y la actividad lactaldehido deshidrogenasa (◦).

En las fracciones correspondientes al gradiente, se determinó la concentración de NaCl (---).



ambas actividades en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex a partir de un extracto celular de la cepa EG3 (apartado 3.4.1.) se pensó en seguir todos los pasos de la purificación del enzima glicolaldehido deshidrogenasa (tabla 2) por medición de los dos tipos de actividad enzimática glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa según los ensayos descritos en los apartados 2.4.2.1. y 2.4.2.2. respectivamente a fin de comprobar la copurificación de ambas actividades y en la misma proporción a lo largo de todo el proceso.

Para ello se partió de 5 l. de cultivo de la cepa EG3 crecida en hidrolizado de caseína al 0,5%. Se obtuvo el extracto celular tal como se indica en el apartado 2.3 y se procedió a purificar ambas actividades a partir del mismo, siguiendo la pauta detallada en la tabla 2.

En la precipitación fraccionada con sulfato amónico se ensayó también la actividad lactaldehido deshidrogenasa en las fracciones que normalmente se desprecian (el precipitado obtenido con la saturación del 50% y el sobrenadante al 75%), siéndole nula en ambos casos. En todos los pasos siguientes que implican la elaboración de varios tipos de cromatografía en columna, la actividad lactaldehido deshidrogenasa se ensayó en todas las fracciones eluidas de cada una de las columnas empleadas y no sólo en las que se correspondían con el pico de actividad glicolaldehido deshidrogenasa. En los tres casos (DEAE-sephadex, AGNAD y ultrogel ACA-34) la actividad lactaldehido deshidrogenasa eluyó conjuntamente con la actividad glicolaldehido deshidrogenasa, no siéndole visible ningún otro pico con actividad.

Finalizado el proceso, se observó que la relación entre ambas actividades se mantenía constante en cada uno de los pasos implicados en la purificación, siendo de 1,7 en el extracto celular y entre 1,64-1,78 a lo largo de todo el proceso.

Todos los datos concernientes a ambas actividades a lo largo de esta copurificación se muestran en la tabla 4.

### 3.4.3. ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DESCRITAS EN EL APARTADO ANTERIOR.

La preparación purificada obtenida en el experimento descrito en el apartado 3.4.2. mostraba los mismos criterios de pureza que los descritos en el apartado 3.2.5.

70  $\mu$ g. de proteína correspondientes a la muestra purificada obtenida en la cromatografía de afinidad se aplicaron por duplicado a un gel de poliacrilamida al 7,5%. Trás realizar la separación electroforética en condiciones no desnaturalizantes (apartado 2.5.1.) se procedió a revelar una de las muestras por actividad glicolaldehido deshidrogenasa y la otra por actividad lactaldehido deshidrogenasa (apartado 2.5.4.) El resultado obtenido se muestra en la figura 13. Como puede observarse, en ambos casos se obtiene una única banda, con igual movilidad electroforética, indicando con ello que ambas actividades copurifican en una misma proteína. El  $R_f$  de estas bandas coincide entre sí, con el observado para la única banda que aparece trás revelar por proteína una separación electroforética de 10  $\mu$ g. de la misma preparación purificada (apartado 3.2.5.), y con la banda "a" del extracto celular descri-



TABLA 4.

CÓPURIFICACION DE LAS ACTIVIDADES GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA

	Actividad GlADH a)	Actividad LaldH b)	Relación GlADH/LaldH
	Unidades Actv.específica c)	Unidades Actv.específica c)	
Extracto celular	273,6	161,0	1,70
Sulfato amónico	195,5	117,3	1,66
DEAE-sephadex	136,5	83,2	1,64
AGNAD eluido con NAD	69,4	38,8	1,77
Ultrogel ACA-34	31,3	17,6	1,78

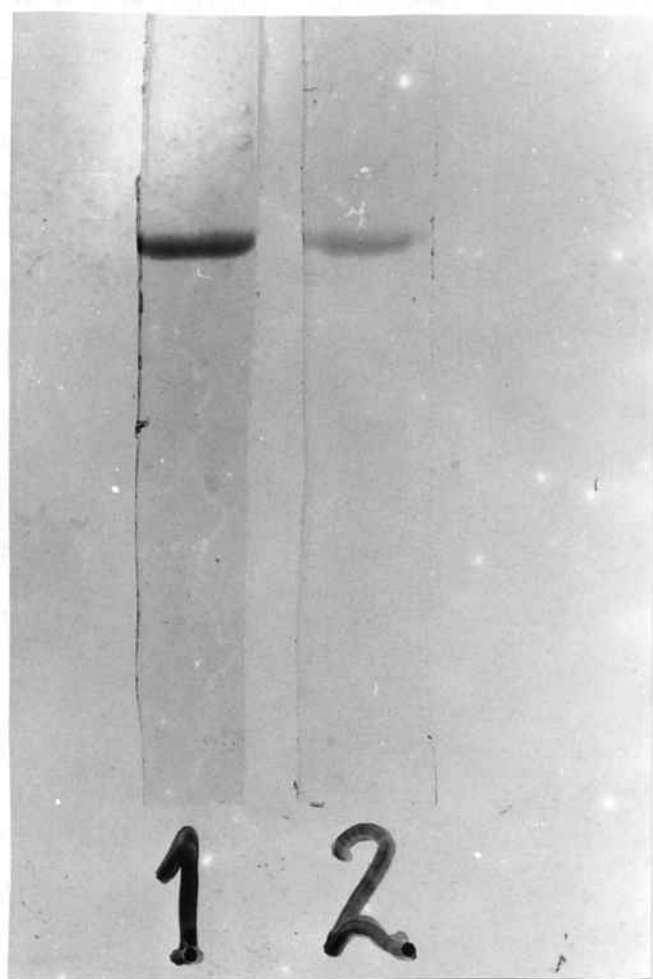
a) Actividad glicolaldehido deshidrogenasa

b) Actividad lactaldehido deshidrogenasa

c) expresada en U/mg de proteína.

FIGURA 13.- MOVILIDAD ELECTROFORETICA DE LAS ACTIVIDADES GLICOLALDEHIDO Y LACTALDEHIDO DESHIDROGENASA DE LA PREPARACION PURIFICADA.

70  $\mu$ g. de proteina de la muestra purificada obtenida de la cromatografía de afinidad (AGNAD) se aplicaron por duplicado a un gel de poliacrilamida. Trás realizar la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, se procedió a revelar por actividad glicolaldehido deshidrogenasa (1) y por actividad lactaldehido deshidrogenasa (2).



ta en el apartado 3.1 (figura 1), que se identifica como la glicolaldehido deshidrogenasa y que a la vez está ausente en el revelado por actividad, tanto glicolaldehido deshidrogenasa como lactaldehido deshidrogenasa, de una separación electroforética de la cepa 40 (mutante propanodiol negativo por carecer de actividad lactaldehido deshidrogenasa).

La muestra purificada obtenida del ultrogel ACA-34 también fue sometida a la misma separación electroforética y posterior revelado por ambas actividades, obteniéndose el mismo resultado que se describe en el párrafo anterior para la muestra procedente del AGNAD. Sin embargo, no ha sido posible mostrarla en este trabajo, pues las bandas del revelado por actividad eran muy débiles, lo que se supone es debido a la alta inestabilidad de esta preparación (apartado 3.2.6.).

Estos resultados electroforéticos, junto con la proporcionalidad existente entre la actividad glicolaldehido deshidrogenasa y la actividad lactaldehido deshidrogenasa a lo largo de todo el proceso de purificación diseñado en nuestro laboratorio para el enzima glicolaldehido deshidrogenasa, y con la ausencia de actividad glicolaldehido deshidrogenasa en la cepa 40, ponen de manifiesto la identidad de ambas actividades como pertenecientes a una única proteína enzimática.

## 4. DISCUSSION.

#### 4.1. INTERES DE LOS ENZIMAS LALDH Y GLADH EN LA EVOLUCION DE VIAS METABOLICAS DE GLICOLES.

Para que un microorganismo pueda utilizar un determinado compuesto como sustrato de crecimiento es necesaria la entrada del mismo a la célula y su transformación, mediante los enzimas apropiados, a metabolitos intermediarios de las vías metabólicas centrales.

Escherichia coli K-12 es incapaz de utilizar propanodiol y etilenglicol como únicas fuentes de carbono y energía, probablemente por no disponer de la maquinaria enzimática necesaria para su completa metabolización.

Por mutagénesis de la cepa salvaje con etilmetanosulfanato se consiguió aislar mutantes capaces de utilizar propanodiol como sustrato de crecimiento, sin embargo no fue posible por este método la obtención de mutantes con la capacidad de degradar etilenglicol (apartado 1.2.1)

Se vió que en los mutantes propanodiol positivos se había hecho constitutiva la producción de un enzima: la propanodiol óxido-reductasa, que es inducible en la cepa salvaje por crecimiento anaeróbico de este microorganismo en L-fucosa. Por la acción de este enzima sobre el propanodiol se forma L-lactaldehído que es oxidado a lactato por la lactaldehído deshidrogenasa presente ya en E. coli K-12 (apartado 1.5.1).

El enzima propanodiol óxido-reductase presentaba una fuerte actividad cruzada sobre el etilenglicol. transformándolo

en glicolaldehido. Esto llevó a la búsqueda de los mutantes etilenglicol positivos a partir de la cepa propanodiol óxido-reductasa constitutiva (cepa 3). El problema que presentaba dicha cepa era su incapacidad de crecer en glicolato, cuyo metabolismo se suponía era necesario para la utilización del etilenglicol. Por lo que primero se obtuvo la cepa G3 (propanodiol positiva, glicolato positivo) y por mutación espontánea de la misma se seleccionó la cepa EG3 por su capacidad de crecer en etilenglicol como única fuente de carbono y energía.

La vía de degradación de este glicol en esta cepa es la que se detalla en el apartado 1.2. que implica que el glicolaldehido formado por la acción de la propanodiol oxidoreductasa sobre el etilenglicol sea oxidado a glicolato por medio de una actividad glicolaldehido deshidrogenasa. Tal como se indica en el mencionado apartado, el glicolato ya es capaz de ser transformado por E. coli a fin de entrar en el metabolismo central.

En el esquema 2 se presenta el paralelismo existente entre estas dos vías de degradación de ámbos glicoles. Así, la propanodiol óxido-reductasa actúa en el primer paso de ámbas vías, formándose los aldehidos correspondientes: el lactaldehido en el caso del propanodiol y el glicolaldehido en el caso del etilenglicol. La próxima actividad involucrada en ámbas vías es la de un aldehido deshidrogenasa que oxida al ácido correspondiente en cada caso. La lactaldehido deshidrogenasa fue descrita por vez primera en la cepa 3, en la vía de degradación del propanodiol, por Sridhara y Wu (65) (apartado 1.5). No está claro cual puede ser el origen de la glicolaldehido deshidrogenasa y

es por ello que una parte de este trabajo está encaminada a tal fin. Leblanc y Mortlock (41) sugirieron ya la posibilidad de que una actividad glicolaldehido deshidrogenasa descrita en un mutante de E. coli capaz de degradar la D-Arabinosa por la utilización de los enzimas de la L-fucosa fuera debida a la acción del enzima lactaldehido deshidrogenasa descrito por Sridhara y Wu (65). Sin embargo estos autores no aportaron evidencia alguna en este sentido. Si ello es cierto, y ambas actividades (la glicolaldehido deshidrogenasa y la lactaldehido deshidrogenasa) se correspondieran con una única proteína enzimática, estaríamos frente a un caso interesante de evolución: la capacidad de utilizar etilenglicol por mutantes de E. coli supondría la utilización de los enzimas que intervienen en la vía de degradación de otro glicol, el propanodiol, que a su vez es una inversión de la vía de fermentación de la L-fucosa en la cepa salvaje.

Es curioso que el esquema encontrado para la utilización del etilenglicol por E. coli concuerda con el descrito anteriormente para otras cepas bacterianas capaces de utilizar este glicol (apartado 1.1.3) y sin embargo esta vía de degradación del etilenglicol en E. coli ha sido construída a través de un proceso de evolución experimental (por aplicación de una fuerte presión selectiva sobre esta bacteria en el laboratorio). Esto indicaría que la evolución de esta nueva vía metabólica ha conducido al mismo modelo que la evolución natural ha producido de forma independiente en otros microorganismos filogenéticamente no relacionados.

Este modelo de evolución experimental es un ejemplo de como la adquisición de una nueva capacidad metabólica favorece



la adquisición de otras, en contra de lo que se había postulado de que la adquisición de una llevaba a la pérdida de otras. Así, los mutantes de E. coli que han adquirido la capacidad de utilizar propanodiol, ven aumentado su potencial evolutivo hacia la utilización de otros compuestos relacionados, como en este caso el etilenglicol.

La acción secuencial de procesos de este tipo, seguidos de duplicación de estos genes y posteriores mutaciones estructurales que modifiquen la reactividad de estos enzimas, sería un mecanismo bastante sencillo que podría dar lugar a un incremento en la diversidad de las funciones metabólicas de un organismo determinado.

La purificación y posterior caracterización de la glicolaldehído deshidrogenasa nos permitirá ahondar más en el origen de este enzima y su posible identidad con la lactaldehído deshidrogenasa.

## 4.2. PURIFICACION DEL ENZIMA GLICOLAL - DEHIDO DESHIDROGENASA.

Uno de los aspectos básicos necesarios para la caracterización tanto cinética como molecular de un enzima es el de disponer de una preparación purificada del mismo.

Varias actividades glicolaldehido deshidrogenasa han sido descritas por varios autores en E. coli (apartado 1.3.1) (41, 50, 64), si bien en ninguno de los casos se procedió a purificar y caracterizar el enzima responsable de dicha actividad, de ahí el interés de este trabajo.

En este sentido, se ha intentado obtener un método de purificación que nos permitiera obtener preparaciones con rendimientos aceptables y con un grado de pureza suficiente para poder llevar a termino los posteriores estudios de caracterización del enzima glicolaldehido deshidrogenasa.

En nuestro laboratorio, se había realizado ya con anterioridad el estudio de algunas de las propiedades de este enzima en extractos celulares de mutantes etilenglicol positivo o en muestras parcialmente purificadas por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex (apartado 1.3.2) (6). Sin embargo los resultados obtenidos debían considerarse como orientativos y no definitivos hasta que fuesen comprobados con la muestra purificada del enzima, lo que se aborda en este trabajo.

La purificación se llevó a termino a partir del extracto celular de la cepa EG3 (mutante etilenglicol positivo)

Tris-HCl 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3 mostraba un volumen de elución de 56,1 ml. y en solución fosfato sódico 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,3, de 66 ml. Una diferencia de 10 ml. en el volumen de elución de un enzima en una columna de gel filtración que dispone de 60 ml. para separar proteínas cuyo peso molecular está comprendido entre 20.000 y 350.000 daltons es bastante elevada. Esto parece indicar que el Tris podría favorecer la agregación del enzima glicolaldehido deshidrogenasa, aunque no podemos precisar cual es el mecanismo. De entrada, una diferencia clara entre ambos compuestos radica en su carga: el Tris es una molécula cargada positivamente y el fosfato presenta carga negativa. Quizás, esta característica de cargas opuestas afecta de modo distinto a la agregación o incluso conformación del enzima.

Por ello, si bien en un principio se usó el tampón Tris-HCl en el intento de purificación de la glicolaldehido deshidrogenasa, posteriormente se escogió el tampón fosfato sódico 10mM, mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,3, como el definitivo.

Los resultados obtenidos en las cromatografías de afinidad (AGNAD) e intercambio iónico (DEAE-sephadex) con ambos tampones son los mismos, alcanzándose las mismas veces de purificación en las dos condiciones. La única diferencia observada es que la elución de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa en la columna de (DEAE-sephadex) se consigue a una concentración de NaCl de aproximadamente 260 mM con tampón fosfatos, mientras que con solución Tris-HCl eluye

a 320 mM NaCl.

La secuencia de procesos en esta purificación ha quedado establecida como sigue: precipitación fraccionada con sulfato amónico (50-75%), cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex, cromatografía de afinidad en agarosa-NAD y cromatografía de gel-filtración en ultrogel ACA-34 (tabla 2).

También se intentó realizar la cromatografía de gelfiltración antes que la de afinidad, evitándose así una diálisis antes de este paso. El resultado obtenido en este caso no era del todo satisfactorio, puesto que, no mejoraba mucho el rendimiento del próximo paso y teniendo en cuenta además, que la elución del enzima de la cromatografía de afinidad se efectúa con un gradiente de NAD se creyó más conveniente realizar la cromatografía de gelfiltración posterior a la de afinidad ya que nos dejaba la muestra libre de NAD, condición indispensable para realizar los estudios cinéticos del cofactor.

La precipitación con sulfato amónico permite la concentración del enzima tan necesaria en los procesos de diálisis ya que los mismos resultan catastróficos para la actividad glicolaldehído deshidrogenasa en muestras protéicas diluídas.

La cromatografía de afinidad (13) ha sido utilizada ampliamente a lo largo de los últimos años para la purificación de enzimas. En el caso concreto de las deshidrogenasas se han desarrollado una gran variedad de matrices y grupos funcionales que han sido utilizados con éxito para la purificación de un

número considerable de enzimas. En la purificación de la glicolaldehído deshidrogenasa se ha probado la cromatografía de afinidad en agarosa-NAD (AGNAD) con resultados satisfactorios. De entrada, hay que comentar la gran capacidad de esta matriz, , pues sólo 5 ml del gel son capaces de fijar toda la muestra procedente de 5 l de cultivo de la cepa EG3 sometida a precipitación fraccionada con sulfato amónico y a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex. Si bien el flujo utilizado para este tipo de cromatografías es más bien lento, la ventaja de trabajar con columnas de pequeño volúmen es el ahorro de tiempo que esto significa.

Están descritos dos tipos de elución para las cromatografías de afinidad (45, 46): a) técnicas inespecíficas de elución (por fuerza iónica, pH, temperatura, etc.) b) técnicas específicas de elución , mediante el empleo del cofactor o de la forma reducida del mismo, siendo estas técnicas más efectivas en muestras bastantes purificadas. Estas técnicas específicas dan siempre mejores resultados que las inespecíficas, siendo un gradiente lineal del cofactor apropiado la técnica de elución más eficaz y selectiva para las cromatografías de afinidad, si bien el elevado precio de estos cofactores limita su uso.

En el caso concreto de la glicolaldehído deshidrogenasa se han probado los dos tipos de elución: 1) una inespecífica con un gradiente lineal de cloruro sódico entre 0 y 1 M consiguiendo 18-20 veces de purificación con respecto al extracto celular; 2) una específica con un gradiente lineal de cofactor entre 0 y 15 mM NAD consiguiendo mejorar la eficacia, pues se obtenía una purificación respecto al extracto celular

del orden de 45 veces. Se pensó también en eluir la actividad glicolaldehído deshidrogenasa de esta columna de afinidad por el empleo del sustrato de la reacción (el glicolaldehído), pero está descrito que el sustrato sólo parece no ser efectivo en la elución del enzima responsable de su catálisis (46).

En la purificación de la 2-ceto-3-deoxi-L-fuconato óxido-reductasa dependiente de NAD de hígado de cerdo se emplea como último paso la cromatografía de afinidad en AGNAD y se eluye con NAD 5 mM consiguiendo excelentes resultados pues se llega a 3.000 veces de purificación (51). En nuestro caso, este procedimiento cromatográfico no ha resultado tan eficaz, pero si lo suficiente, pues la preparación obtenida en este paso presenta ya muy pocas proteínas contaminantes.

La preparación enzimática obtenida por la elución con un gradiente lineal de cofactor debía de concentrarse hasta un volumen de 1-2 ml para poder ser aplicada a la columna de ultrogel ACA-34. La gelfiltración como último paso aporta la ventaja de la eliminación del NAD de la muestra purificada, evitando así que su presencia interfiera en los estudios cinéticos.

Las preparaciones obtenidas a través del procedimientos de purificación descrito en el apartado 3.2 eran altamente inestables, pues congeladas a  $-40^{\circ}\text{C}$  incluso después de ser concentradas perdía un 90% de la actividad en 24-48 horas. La estabilización del enzima purificado está en estudio. Estas preparaciones daban una banda y un contaminante después de realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y teñir con azul brillante de Coomassie (figura 8).

La banda de mayor movilidad electroforética, que se corresponde con la menos aparente puede ser una proteína contaminante. Lo curioso de esta banda es que aparece ya cuando se aplican a la electroforésis 10  $\mu\text{g}$ . de proteína y sin embargo, esta no es más aparente y tampoco aparecen más bandas correspondientes a otras proteínas contaminantes cuando se aumenta la cantidad de proteína aplicada incluso hasta 75  $\mu\text{g}$ . También se ha pensado en la posibilidad de que sea un subproducto de proteólisis del enzima nativo, puesto que este fenómeno está descrito para algunos enzimas purificados y guardados durante tiempo; sin embargo, no suele ocurrir con preparaciones frescas. Este aspecto será también estudiado en un futuro muy próximo.

La muestra procedente de la elución específica de la cromatografía de afinidad, concentrada y guardada a  $-40^{\circ}\text{C}$  resulta más estable. En cuanto a su grado de pureza hay que decir que 10  $\mu\text{g}$ . de proteína en una electroforésis en geles de poliacrilamida dan una sola banda cuando se teñen con azul brillante de Coomassie, sin embargo con cantidades mayores de proteína aparecen ligeras bandas contaminantes (figura 7).

Con este método de purificación se ha conseguido obtener el enzima glicolaldehído deshidrogenasa purificado casi a homogeneidad (las impurezas se estima que están en muy baja proporción. Puesto que la electroforésis de 10  $\mu\text{g}$ . de la proteína purificada permiten visualizar una única banda y dado que cantidades menores de 0,5  $\mu\text{g}$ . son difícilmente visualizables con estos métodos de tinción, puede estimarse que las impurezas en nuestra muestra serían menores de un 5%, teniendo en cuenta además que después de la cromatografía de afinidad todavía se realiza otra cromatografía. El factor de purifica-



ción es de 87 veces y el rendimiento obtenido alrededor de un 11%.

Se han probado otro tipo de columnas aparte de las ya citadas en este apartado, pero no han sido efectivas en el caso de la glicolaldehido deshidrogenasa. Así la cromatografía de intercambio iónico (carboximetil-celulosa) desarrollada a pH5 resultó ineficaz en la fijación del enzima y no se creyó oportuno realizarla a pH inferiores porque la estabilidad del enzima se veía muy afectada ( apartado 3.2.2).

Por otra parte, se pensó que la cromatografía de afinidad en Afi-gel blue podría resultar eficaz, puesto que el grupo cromóforo acoplado a la matriz se asemeja a los nucleótidos de la adenina, y ha sido utilizada con éxito en la purificación de otras deshidrogenasas y kinasas. Sin embargo, el enzima glicolaldehido deshidrogenasa no es capaz de unirse a la matriz cromatográfica bajo ninguna de las condiciones de pH empleadas (apartado 3.2.3.1).



### 4.3. ACTIVIDAD DE LA GLICOLALDEHIDO DESHIDROGENASA PURIFICADA SOBRE OTROS ALDEHIDOS.

Ya se había ensayado la capacidad del enzima glicolaldehido deshidrogenasa de catalizar la deshidrogenación de otros aldehidos utilizando como fuente enzimática un extracto celular de la cepa EG3 (6) (apartado 1.3.2.). De varios aldehidos ensayados, el enzima sólo se mostró activo sobre glicolaldehido, L-lactaldehido, L-gliceraldehido.

En este trabajo se ha pretendido llevar a cabo el estudio de la actividad del enzima glicolaldehido deshidrogenasa sobre estos aldehidos, para los que el enzima se había mostrado ya activo en los extractos celulares.

El estudio del efecto de la concentración de aldehido mostraba en los tres casos una inhibición a elevadas concentraciones del mismo, siendo los perfiles obtenidos distintos según el aldehido (apartado 3.3.1.). La inhibición más marcada era la presentada por el L-lactaldehido (figuras 9A, 10A, 11A).

La concentración de aldehido en el ensayo que ofrecía la máxima actividad enzimática ya indicaba que el enzima presentaba mayor afinidad por el L-lactaldehido, sin embargo, se determinó el valor de la  $K_m$  para los tres aldehidos a fin de saber cual podría ser el sustrato fisiológico (apartado 3.3.2.) (figuras 9B, 10B, 11B).

El valor de la  $K_m$  obtenido para el glicolaldehido fue de  $3,3 \times 10^{-4}$  M, que concuerda con el obtenido previamente en

extractos celulares de mutantes etilenglicol positivos. El valor de la  $K_m$  hallado para el L-lactaldehído fue de  $2,2 \times 10^{-5}$  M y de  $1,3 \times 10^{-4}$  M para el L-gliceraldehído.

El aldehído para el cual el enzima presentaba una  $K_m$  más baja era el L-lactaldehído, indicando con ello que presentaba mayor afinidad por él y que bien pudiera ser su sustrato fisiológico, aunque para poder afirmar este hecho, es mejor indicador el papel inductor que el sustrato natural ejerce sobre los niveles de actividad enzimática.

En todos estos ensayos de actividad del enzima glicolaldehído deshidrogenasa sobre varios sustratos se ha empleado como fuente enzimática la preparación obtenida de la cromatografía de afinidad (AGNAD) eluida específicamente, que si bien no es una muestra purificada a homogeneidad (figura 7), si lo es lo suficiente para este tipo de ensayos, pues no hay ninguna proteína contaminante en este paso que pueda interferir en el sistema de ensayo, tal como lo demuestra la única banda observada tras revelar por actividad glicolaldehído deshidrogenasa una separación electroforética de esta preparación enzimática (apartado 3.2.5.). La razón por la que se utilizó esta preparación enzimática y no la procedente del ultrogel ACA-34 es la alta inestabilidad de la última (apartado 3.2.6.). La muestra obtenida por cromatografía de afinidad se muestra más estable, guardada en las mismas condiciones, quizás porque la concentración de proteína es mayor en este paso, o incluso, podría ser debido a un efecto estabilizador del NAD, tal como está descrito para otras deshidrogenasas (4).

#### 4.4. EVIDENCIAS DE QUE AMBAS ACTIVIDADES SON FUNCION DE LA MISMA PROTEINA.

Ya se indicó en el apartado 1.6. que las actividades glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa podrían ser función de una misma proteína enzimática. Esta suposición, fue hecha en un principio por Leblanc y Mortlock (41) y apoyada por una serie de evidencias en relación a ambas actividades analizadas en varias cepas en nuestro laboratorio con anterioridad a esta trabajo ( apartado 1.6.),

Sin embargo, las características descritas por Sridhara y Wu (65) para la lactaldehido deshidrogenasa no concuerdan en algunos aspectos con las halladas en nuestro laboratorio para la glicolaldehido deshidrogenasa.

El interés evolutivo que supondría la identidad de ambos enzimas ya se indicó en el apartado 4.1. Por ello, se plantearon una serie de experimentos encaminados a demostrar la identidad o diversidad de estos enzimas.

El primer resultado orientativo en este sentido fue el idéntico perfil de bandas obtenido al revelar por actividad lactaldehido deshidrogenasa y glicolaldehido deshidrogenasa una separación electroforética del extracto celular de la cepa EG3 ( figura 1).

Otro factor positivo en la comprobación de la identidad de ambos enzimas es la ausencia de actividad glicolaldehido deshidrogenasa en el extracto celular de la cepa 40 (propanodiol ne-

gativo por carecer de actividad lactaldehído deshidrogenasa). El hecho de que al revelar por ambas actividades una separación electroforética del extracto celular de la cepa 40, los dos perfiles obtenidos sean idénticos y además carezcan ambos de la misma banda (la banda "a" de la figura 1) apoya la suposición, de que la actividad glicolaldehído deshidrogenasa, presente en E. coli y necesaria para el metabolismo del etilenglicol, es función del enzima glicolaldehído deshidrogenasa.

Otro resultado positivo en este sentido, fue la copurificación de las actividades glicolaldehído deshidrogenasa y lactaldehído deshidrogenasa en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex a partir de un extracto celular de la cepa EG3, manteniéndose la relación  $Gla\ DH/Lal\ DH$  constante durante el proceso e igual a la del extracto celular (apartado 3.4.1.)

Cuando ya se disponía del método de purificación para la glicolaldehído deshidrogenasa (apartado 3.2), se pensó en seguir todos los pasos del proceso para ambas actividades a fin de comprobar si ambas enzimas copurificaban. El resultado esquematizado en la tabla 3 así lo indica, manteniéndose la relación constante a lo largo de todo el proceso, lo que es congruente con el hecho de ser ambas actividades función de una misma proteína. La figura 16 apoya esta identidad, pues las bandas obtenidas al revelar por actividad glicolaldehído deshidrogenasa y lactaldehído deshidrogenasa, una separación electroforética de la muestra purificada, coinciden entre sí y con la única banda observada al revelar por proteína  $10\ \mu g.$  de la misma muestra (apartado 3.5.). No parece por tanto que

exista otra proteína con distinta movilidad e igual función. Así mismo, esta única banda observada en los dos tipos de revelado, concuerda con la banda "a" del extracto celular de la cepa EG3, identificada como la glicolaldehido deshidrogenasa y que a su vez está ausente de los revelados por actividad lactaldehido deshidrogenasa y glicolaldehido deshidrogenasa de una separación electroforética del extracto celular de la cepa 40.

En relación a la proporción de ambas actividades en los extractos celulares de la cepa EG3, hay que decir, que si bien la actividad glicolaldehido deshidrogenasa es siempre superior a la actividad lactaldehido deshidrogenasa, bajo las condiciones de ensayo fijadas para ambos enzimas en los apartados 2.4.2.1 y 2.4.2.2. respectivamente, es difícil fijar un valor para la relación glicolaldehido deshidrogenasa/lactaldehido deshidrogenasa, puesto que varía de unos extractos a otros. Así, por ejemplo, esta relación en el extracto celular, que sirvió de partida para la copurificación de ambas actividades en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex, era de 2,12 (apartado 3.4.1.), y la obtenida en el extracto celular, a partir del cual se inició el proceso de copurificación de ambas actividades siguiendo la pauta descrita para el enzima glicolaldehido deshidrogenasa, era de 1,7 (apartado 3.4.2.). Esta diferencia en la mencionada relación no anula la validez del experimento y su resultado, ya que lo que interesa para demostrar una copurificación, es que la relación se mantenga constante a lo largo del mismo experimento, independientemente de otro.

La explicación a la variabilidad de esta relación de actividades, de unos extractos a otros, se puede buscar en la naturaleza del L-lactaldehido empleado como sustrato de la reac-

ción enzimática de la lactaldehido deshidrogenasa. Si bien en los dos casos se empleó L-lactaldehido purificado (apartado 2.7.2), el estrecho margen de concentraciones óptimas de L-lactaldehido en el ensayo, y toda la manipulación implicada en la síntesis, purificación y valoración de este aldehido, pueden llevar a una variación en las condiciones de trabajo, problema que no se presenta en el caso del glicolaldehido por ser un producto comercial fácilmente asequible, de fácil síntesis y mayor pureza.

Así pues, los resultados obtenidos en los apartados 3.1. y 3.4. demuestran la identidad de ambas enzimas. Además, con el mismo fin, se están llevando a cabo en nuestro laboratorio, estudios de otro tipo (inducción de ambas actividades bajo distintas condiciones de crecimiento de varias cepas) y los resultados obtenidos hasta el momento concuerdan con los aquí expuestos.

Si todos los datos de los que se dispone aportan evidencias de que ambas actividades se corresponden con una única proteína enzimática ¿cómo se explica la diferencia en alguna de las características observadas para ambas enzimas?. En primer lugar, hay que decir, que las condiciones de ensayo descritas por Sridhara y Wu (65) para el enzima lactaldehido deshidrogenasa son muy distintas a las utilizadas en nuestro laboratorio para la glicolaldehido deshidrogenasa, lo cual puede influir en el estudio de las características de los mismos.

La solución amortiguadora de pH en la mezcla de reacción enzimática, empleada por estos autores, era la de carbonato-bicarbonato sódico 25 mM., pH 10,5, y la concentración



de L-lactaldehído en el ensayo era de 20 mM. Como puede apreciarse es una concentración muy elevada en relación con las ensayadas en nuestro laboratorio para la glicolaldehído deshidrogenasa, incluso la lactaldehído deshidrogenasa. Esto es debido, probablemente, a que el L-lactaldehído que utilizaban estos autores era obtenido por síntesis a partir de treonina y ninhidrina (apartado 2.7.1) y utilizado sin ningún tipo de purificación ni desdimerización. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un sistema de purificación del L-lactaldehído sintetizado por este método, basado en una cromatografía en papel (apartado 2.7.2.). Si bien el rendimiento de esta purificación es bajo, el L-lactaldehído obtenido es mucho más eficaz que el impurificado, puesto que la concentración óptima del mismo en el ensayo enzimático es de 0,05 mM (concentración mucho menor que la descrita por Sridhara y Wu de 20 mM). Estos resultados parecen indicar que el L-lactaldehído obtenida por la mencionada síntesis, llevaría consigo una impureza que afectaría de modo considerable a la actividad glicolaldehído deshidrogenasa, obligando a incrementar mucho la concentración de sustrato en el ensayo y aún así, la actividad específica determinada bajo estas condiciones, en el extracto celular, es del orden de 10-15 veces inferior a la obtenida con el lactaldehído purificado.

También se ha visto que es necesario proceder a la desdimerización del L-lactaldehído antes de cada determinación de la actividad enzimática, puesto que se ha observado que esta es menor cuando se usa como sustrato una solución de L-lactaldehído no recientemente preparada. Esto es debido, a que como consecuencia de la dimerización (fenómeno descrito para los  $\alpha$ -hidroxi-

aldehidos en solución, con el tiempo) (43), el n° de grupos aldehido disponibles para la reacción enzimática es menor e incluso se puede pensar que el dímero tenga algún efecto inhibitor.

Basándonos en esta diferencia de concentraciones de sustrato en el ensayo de la actividad lactaldehido deshidrogenasa, se puede explicar una de las discrepancias más evidentes entre las actividades glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa: Sridhara y Wu describían a este último como específico para el L-lactaldehido, sin embargo, el enzima glicolaldehido deshidrogenasa presenta actividad sobre varios aldehidos, glicolaldehido, L-lactaldehido y L-gliceraldehido (lo que si es cierto, es que presenta especificidad por el isómero L y parecer ser necesaria la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono n°2). Esta discrepancia puede explicarse por el fenómeno de inhibición por sustrato que presentan estos aldehidos a elevadas concentraciones, por lo que podemos suponer que en el caso del L-gliceraldehido, a la concentración de 20 mM, el enzima está prácticamente inhibido (la actividad observada por estos autores usando este aldehido como sustrato era de un 3% con respecto a la observada con L-lactaldehido a la misma concentración). Lamentablemente estos autores no ensayaron la actividad lactaldehido deshidrogenasa en presencia de glicolaldehido.

El pH óptimo descrito para ambos enzimas es distinto, quizás en este sentido pueda influir el hecho de que los tampones empleados en la medición de ambas actividades son distintos.

En cuanto a los cofactores, Sridhara y Wu describen que la lactaldehido deshidrogenasa, por ellos purificada, no es capaz



de utilizar como cofactor el NADP, sin embargo la glicolaldehido deshidrogenasa ensayada en extractos celulares, sí puede utilizarlo, aunque la actividad enzimática obtenida es 10 veces inferior a la ensayada en presencia de NAD. Esta diferencia puede explicarse también, en función de las distintas condiciones de ensayo.

Reversibilidad de la reacción: la lactaldehido deshidrogenasa purificada, como la mayoría de las aldehido deshidrogenasas, es incapaz de catalizar la reacción inversa, es decir, la reducción del ácido. La explicación está en que termodinámicamente parece improbable la reversibilidad, por presentar una energía de activación muy elevada en el sentido de la reducción del ácido. Sin embargo, la actividad glicolaldehido deshidrogenasa parece ser reversible, pues al añadir a la mezcla de ensayo glicolato (a elevada concentración 180 mM) tiene lugar una disminución de la absorbancia a 340 nm por desaparición del NADH. Si bien este estudio de reversibilidad de la reacción fue hecho con una muestra parcialmente purificada por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex, tendría que comprobarse con el enzima purificado, puesto que la oxidación del NADH observada pudiera ser debida a otra actividad capaz de reducir el glicolato.

Como puede apreciarse las diferencias observadas en algunas de las características de ambas actividades pueden explicarse por las distintas condiciones de ensayo de las mismas, e incluso porque las características descritas para la glicolaldehido deshidrogenasa, a excepción de la especificidad de sustrato, no han sido estudiadas en muestras purificadas.

Hay algunas características que concuerdan: necesidad de mercaptoetanol y EDTA en el proceso de purificación y en las diálisis; y que la incubación en presencia de sustrato o cofactor no modifica la actividad enzimática.

Hay otras propiedades que no pueden compararse, puesto que todavía no han sido estudiadas para la glicolaldehido deshidrogenasa (peso molecular, n° de subunidades, activadores e inhibidores, etc.), pero que serán objeto de estudio próximamente, ahora que se dispone de un sistema de purificación para la glicolaldehido deshidrogenasa, y que ayudarán a elucidar la posible identidad de los enzimas glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa.

Aclarando estas discrepancias en determinadas propiedades de ambos enzimas y basándonos en los resultados obtenidos en los apartados 3.1. y 3.4., podemos considerar que las evidencias nos conducen a identificar las actividades glicolaldehido deshidrogenasa y lactaldehido deshidrogenasa con una sola proteína enzimática.

Si la actividad glicolaldehido deshidrogenasa descrita en la cepa EG3 y en otros mutantes etilenglicol positivos, y necesaria para el metabolismo del etilenglicol, es debida al enzima lactaldehido deshidrogenasa presente en E.coli, podemos preguntarnos el porqué la cepa G3 no es capaz de utilizar etilenglicol como única fuente de carbono y energía a pesar de que dispone de todos los enzimas necesarios para su metabolización:

- 1) propanodiol óxido-reductasa
- 2) lactaldehido deshidrogenasa
- 3) glicolato oxidasa.

La respuesta parece ser el que los nive-

les de actividad lactaldehido deshidrogenasa ( que en este caso actuaría como glicolaldehido deshidrogenasa) no son suficientes, ya que la selección de la cepa EG3 por su caracter etilenglicol positivo lleva consigo un aumento en los niveles constitutivos de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa. Este aumento puede explicarse, bien por una mayor producción del enzima, o bien por una modificación en la reactividad del mismo, haciéndolo más activo.

La insuficiencia de los niveles de actividad oxidativa de aldehido en la cepa G3 vendrían además agravados específicamente para el glicolaldehido por el hecho de que la deshidrogenasa presenta una elevada  $K_m$ , por tanto una baja afinidad por este sustrato.

## 5. CONCLUSIONES.

- Los extractos celulares de la cepa EG3 (mutante etilenglicol positivo), cultivada en hidrolizado de caseína, presentan niveles de actividad del orden de 0,35-0,40 U/mg de proteína para la glicolaldehido deshidrogenasa y del orden de 0,20-0,25 U/mg de proteína para la actividad lactaldehido deshidrogenasa.
- El enzima glicolaldehido deshidrogenasa necesario para el metabolismo del etilenglicol en mutantes de Escherichia coli K-12, puede ser purificado en un proceso consistente en la aplicación consecutiva de los siguientes métodos de purificación: precipitación fraccionada con sulfato amónico (50-75% de saturación), cromatografía de intercambio iónico (DEAE-sephadex), cromatografía de afinidad (AGNAD) con elución específica por gradiente de NAD y cromatografía de gel filtración (ultrogel ACA-34).
- La preparación obtenida por elución específica de la cromatografía de afinidad se muestra ya muy purificada, si bien no lo está a homogeneidad (las impurezas constituyen alrededor del 5%)
  - . En electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes se obtiene solo una banda por tinción con azul brillante de Coomassie, cuando se aplicaban 10  $\mu$ g de proteína; sin embargo, al aplicar 20  $\mu$ g de proteína o más, aparecían ligeras bandas no bien definidas.
  - . En electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, se obtiene sólo una banda de ac-

tividad glicolaldehido deshidrogenasa, incluso cuando se aplican grandes cantidades de proteina ( 70  $\mu$ g.).

- La preparación de glicolaldehido deshidrogenasa purificada, obtenida por gel filtración (ultrogel ACA-34) era casi homogénea desde el punto de vista electroforético, ya que:
  - . En electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se obtenía una banda muy aparente y otra contaminante por tinción con azul brillante de Coomassie, cuando se aplicaban 10  $\mu$ g de proteina. Al aplicar incluso 75  $\mu$ g no aparecían más bandas contaminantes.
- Las preparaciones de glicolaldehido deshidrogenasa purificada se conservaban concentradas, en alicuotas de 100  $\mu$ l., a -40°C. La inestabilidad de la muestra en este último paso de la purificación es muy grande (se pierde el 90% de la actividad en 24-48 horas a -40°C).
- El enzima glicolaldehido deshidrogenasa presenta actividad cruzada sobre otros aldehidos, en concreto: L-lactaldehido y L-gliceraldehido.
  - . Los valores de Km hallados para la glicolaldehido deshidrogenasa purificada, para los distintos aldehidos son: 3,3x10<sup>-4</sup> M para el glicolaldehido; 1,3x10<sup>-4</sup> M para el L-gliceraldehido; y 2,2x10<sup>-5</sup> M para el L-lactaldehido.
  - . Los valores de Vmax hallados para la glicolaldehido deshidrogenasa purificada, para los distintos aldehidos, expresadas en Unidades/mg de proteina son :

19,58 U/mg para el glicolaldehido; 11,10 U/mg para el L-gliceraldehido y 3,40 U/mg para el L-lactaldehido.

- La actividad glicolaldehido deshidrogenasa descrita en el metabolismo del etilenglicol en mutantes de E.coli es función del enzima lactaldehido deshidrogenasa, sintetizado constitutivamente en E.coli K-12, inducible por el crecimiento de esta cepa en L-fucosa y descrito por vez primera en la vía de degradación del L-1,2-propanodiol.
- La identificación de ambas actividades como función de una misma proteína se pone de manifiesto por:
  - . El extracto celular de la cepa EG3, separado electroforeticamente y revelado por actividad glicolaldehido y lactaldehido deshidrogenasa, muestra idéntico perfil de bandas en ambos casos.
  - . El ensayo de actividades enzimáticas en el extracto celular de la cepa 40, descrita como una cepa propanodiol negativa por carecer de actividad lactaldehido deshidrogenasa, mostró un valor nulo, no sólo para esta actividad, sino también para la actividad glicolaldehido deshidrogenasa. Así mismo, al revelar por ambas actividades un extracto celular de la cepa 40, separado electroforeticamente, se observa en ambos casos la ausencia de la misma banda, identificada en nuestro laboratorio como la responsable de la actividad glicolaldehido deshidrogenasa.
  - . Las actividades enzimáticas lactaldehido deshidrogenasa y glicolaldehido deshidrogenasa copurifican en una cro-

- matografía de intercambio iónico en DEAE-sephadex, a partir de un extracto celular de la cepa EG3, manteniéndose la relación entre ambas constante a lo largo del proceso.
- Ambas actividades copurifican también a lo largo de todo el método de purificación diseñado para la glicolaldehido deshidrogenasa con dos características importantes:
    - La relación entre ambas actividades se mantiene constante a lo largo de todo el proceso.
    - La preparación purificada, aplicada a una electroforesis en geles de poliacrilamida y revelada posteriormente por las actividades lactaldehido deshidrogenasa y glicolaldehido deshidrogenasa, muestra una sola banda en cada caso, ambas con la misma movilidad electroforética y a la vez coincidentes con la única banda observada al revelar, con azul brillante de Coomassie, 10  $\mu$ g de proteína de la muestra purificada aplicada a una electroforesis en las mismas condiciones.



## 6. BIBLIOGRAFIA.

1. BACHMANN, B.J. (1972). Pedigrees of some mutants strains of Escherichia coli K-12. *Bacteriol. Rev.*, 36:525-557.
2. BENSADOUN, A. y D. WEINSTEIN. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering material. *Anal. Biochem.*, 70: 241-250.
3. BLACK, S. (1955). Potassium-activated yeast aldehyde dehydrogenase. En *Methods in Enzymology*, Vol. I, pag.:508-511.
4. BORONAT, A. (1980). Caracterizació de l'enzim propanodiol óxido-reductasa produït per soques de 'E.coli en diferents estadis d'evolució experimental. Tesis doctoral, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona.
5. BORONAT, A., E. CABALLERO y J. AGUILAR. (1982). Experimental evolution of a metabolic pathway for ethylene glycol utilization in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* (en prensa).
6. CABALLERO, E. (1980). Evolució experimental de vies metabòliques: utilització de etilenglicol per mutants de Escherichia coli K-12. Memoria de licenciatura, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona.
7. CHERONIS, M.D. y T.S. MA. (1964). Organic group functional analysis. Pag.:502-504. Interscience Publishers, John Wiley and sons, Inc. New York.
8. CHILD, J y A. WILLETTS. (1978). Microbial metabolism of aliphatic glycols: bacterial metabolism of ethylene glycol. *Biochem. Biophys. Acta*, 538:316-327.
9. CHIU, T.H. y D.S. FEINGOLD. (1964). The purification and properties of L-rhamnulokinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 92: 489-497.
10. CHIU, T.H. y D.S. FEINGOLD. (1969). L-rhamnulose-1-phosphate aldolase from E.coli. Crystallization and properties. *Biochemistry*, 8:98-102.

11. COCKS, G.T., J. AGUILAR y E.C.C. LIN. (1974). Evolution of L-1,2-propanediol catabolism in E.coli by recruitment of enzymes for L-fucose and L-lactate metabolism. *J. Bacteriol.*, 118:83-88.
12. COX, D.P. (1978). The biodegradation of polyethylene glycols. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 23. Ed. by D. Perlman. Pag.: 173-194.
13. CUATRECASAS, P. y C.B. ANFINSEN. (1971). Affinity chromatography. *Ann. Rev. Biochem.*, 40:259-278.
14. DAWSON, R.M.C., D.C. ELLIOT, W.H. ELLIOT y K.M. JONES. (1969). Detection of biochemical compounds. En *Data for Biochemical Research*. Pag. 517. Oxford University Press.
15. DAWSON, R.M.C., D.C. ELLIOT, W.H. ELLIOT y K.M. JONES. (1969). Preparation and composition of biochemical reagents. En *Data for Biochemical Research*. Pag. 616. Oxford University Press.
16. DELEY, J. y K. KERSTERS. (1964). Oxidation of aliphatic glycols by acetic acid bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 28:164-180.
17. ECKFELDT, J., L. MOPE, K. TAKIO y T. YONETANI. (1976). Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of two isozymes. *J. Biol. Chem.*, 231:236-240.
18. FINCHER, E.L. y W.J. PAYNE. (1962). Bacterial utilization of ether glycols. *Appl. Microbiol.*, 10:542-547.
19. FURUYA, A. y J.A. HAYASHI. (1963). Glycolic acid oxidation by E.coli adapted to glycolate. *J. Bacteriol.*, 85:1129-1131.
20. GABRIEL, O. (1971). Locating enzymes on gels. En *Methods in Enzymology*, vol XXII, pag.:578-604. Academic Press Inc. N.Y.
21. GHALAMBOR, M.A. y E.C. HEATH (1962). The enzymatic cleavage of L-fucose-1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 237:2427-2433.

22. GONZALEZ, C.F., W.A. TABER y M.A. ZEITOUN. (1972). Biodegradation of ethylene glycol by a salt-requiring bacteria. *Appl. Microbiology*, 24:911-919.
23. GORNALL, A.G., C.J. BARDAWILL y M.M. DAVID. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751-766.
24. GREEN, M. y S.S. COHEN. (1956). The enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose. *J. Biol. Chem.*, 219:557-568.
25. HACKING, A.J. y E.C.C. LIN. (1976). Disruption of the fucose pathway as a consequence of genetic adaptation to propane-diol as a carbon source in E.coli. *J. Bacteriol.*, 126:1166-1172.
26. HACKING, A.J., J. AGUILAR y E.C.C. LIN. (1978). Evolution of propanediol utilization in E.coli: mutant with improved substrate-scavenging power. *J. Bacteriol.*, 136:522-530.
27. HAINES, J.R. y M. ALEXANDER. (1974). Microbial degradation of polyethylene glycols. *Appl. Microbiol.*, 29:621-625.
28. HANSEN, R.W. y J.A. HAYASHI. (1962). Glycolate metabolism in E.coli. *J. Bacteriol.*, 83:679-687.
29. HEATH, E.C. y M.A. GHALAMBOR. (1962). The purification and properties of L-fuculosa kinase. *J. Biol. Chem.*, 237:2423-2426.
30. HUFF, E. (1961). The metabolism of 1,2-propanediol. *Biochim. Biophys. Acta*, 48:506-517.
31. ISHERWOOD, F.A. y C.S. HANES. (1953). Separation and estimation of organic acids on paper chromatograms. *Biochem. J.*, 55:824-830.
32. JAKOBY, W.B. (1958). Aldehyde oxidation. I Dehydrogenase from Pseudomonas fluorescens. *J. Biol. Chem.*, 232:75-87.
33. JAKOBY, W.B. (1958). Aldehyde oxidation. II Evidence for closely juxtaposed sulfhydryl groups on dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 232:89-97.

34. JAKOBY, W.B. (1963). Aldehyde dehydrogenases. En the Enzymes, vol. VII, pag.:203-221. Academic Press, N.Y. y Londres.
35. JONES, N. y G.K.WATSON. (1976). Ethylene glycol and polyethylene glycol catabolism by a sewage bacterium. Biochemical Society Transactions, 4:891-892.
36. KORNBERG, H.L. y A.M.GOTTO. (1959). Biosynthesis of cell constituents from C<sub>2</sub> compounds: formation of malate from glyoxylate by Pseudomonas ovalis Chester. Nature, 183:1791-1793.
37. KORNBERG, H.L. y A.M.GOTTO. (1961). The metabolism of C<sub>2</sub> compounds in micro-organisms. 6. Synthesis of cell constituents from glycollate by Pseudomonas sp. Biochem.J., 78:69-82.
38. KORNBERG, H.L. y J.R.SADLER. (1961). The metabolism of C<sub>2</sub> compounds in micro-organisms. 8. A dicarboxylic acid cycle as a route for the oxidation of glycollate by E.coli. Biochem.J. 81:503-516.
39. KRAKOW, G.Y. y S.S.BARKULIS. (1956). Conversion of glyoxylate to hidroxypyruvate by extracts of E.coli. Biochim.Biophys. Acta, 21:593-594.
40. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.
41. LEBLANC, D.J. y R.P.MORTLOCK. (1971). Metabolism of D-arabino-se: a new pathway in E.coli. J.Bacteriol., 106:90-96.
42. LERNER, S.A., T.T.WU y E.C.C.LIN. (1964). Evolution of a catabolic pathway in bacteria. Science, 146:1313-1315.
43. LEVENE, P.A. y J.WALTI. (1931). Studies in polymerization and condensation of  $\alpha$ -hidroxyaldehydes. J.Biol.Chem., 94:353-372.
44. LINEWEAVER, H. y D.BURK. (1934). Determination of enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56:658-666.

45. LOWE, C.R. (1979). The chromatographic techniques of affinity chromatography. En Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 7. pag.:401-427. Ed. by T.S. Work and E. Work.
46. LOWE, C.R., H.J. HARVEY, D.B. CRAVEN, M.A. KERFOOT, M.E. HOLLOWS y P.D.G. DEAN. (1973). The purification of nicotinamide nucleotide-dependent dehydrogenases on immobilized cofactors. Biochem. J., 133:507-513.
47. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275.
48. MILSTEIN, C. (1961). Inhibition of phosphoglucomutase by trace metals. Biochem. J., 79:591-596.
49. MORITA, H., T. NISHIMURA, Y. TANI, K. OGATA y H. YAMADA. (1979). Bacterial distribution of glycolaldehyde dehydrogenase in relation to vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis. Agric. Biol. Chem., 43: 185-186.
50. MORITA, H., Y. TANI, K. OGATA y H. YAMADA. (1978). Further characterization of glycolaldehyde dehydrogenase isozymes from E. coli B. Involvement in vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis. Agric. Biol. Chem., 42:2077-2081.
51. NWOKORO, N.A. y H. SCHACHTER. (1975). L-fucose metabolism in mammals. Purification of pork liver 2-keto-3-deoxy-L-fucate NAD-oxidoreductase by NAD-agarose affinity chromatography. J. Biol. Chem., 250:6185-6190.
52. OLSON, J.A. (1959). The purification and properties of yeast isocitric lyase. J. Biol. Chem., 234:5-10.
53. ORSTON, L.N. y M.K. ORSTON. (1969). Regulation of glyoxylate metabolism in E. coli K-12. J. Bacteriol., 98:1098-1108.
54. O'SULLIVAN, W.J. y J.F. MORRISON. (1963). The effect of trace metal contaminants and EDTA on the velocity of enzyme catalyzed reactions. Studies on ATP:creatine phosphotransferase.

Biochim.Biophys.Acta; 77:142-144.

55. PARIKH, I., S.MARCH y P.CUATRECASAS. (1974). Topics in the methodology of substitution reactions with agarose. En *Methods in Enzymology*, vol.XXXIV. Pag:77-101.
56. PEARCE, B.A. y M.T.HEYDEMAN. (1980). Metabolism of di(ethylene glycol) (2-(2'-hydroxyethoxy)ethanol) and other short polyethylene glycols by Gram-negative bacteria. *J.Gen.Microbiol.*, 118:21-27.
57. POWER, J.(1976). The L-rhamnose genetic system in E.coli K-12. *Genetics*, 55:557-568.
58. RACKER, E.(1955). Liver aldehyde dehydrogenase. En *Methods in Enzymology*, vol I, pag.:514-517.
59. REILAND, J.(1971). Gel filtration. En *Methods in Enzymology*, vol XXII, pag.287.
60. ROTH, J.R.(1970). Genetic techniques in studies of bacterial metabolism. En *Methods in Enzymology*, vol XVII, pag.:3-35.
61. SAWADA, H. y Y.TAKAGI.(1964). The metabolism of L-rhamnose in E.coli. III L-rhamnulose-phosphate aldolase. *Biochim. Biophys.Acta*, 92:26-32.
62. SCOTT, T.A. y R.C.HOCKNEY.(19719). Synthesis of vitamin B<sub>6</sub> by a mutant of E.coli K-12 and the action of 4'-deoxypyridoxine. *J.Gen.Microbiol.*, 110:285-289.
63. SEEGMILLER, J.E.(1955). TPN linked aldehyde dehydrogenase from yeast. En *Methods in Enzymology*, vol I, pag.:511-514.
64. SHIMIZU, S. y W.DEMPSEY.(1978). Pyridoxine requirement mutants of E.coli: glycolaldehyde dehydrogenase is not coded for by the pdx B gene. *J.Bacteriol.*, 133:1273-1277.
65. SRIDHARA, S. y T.T.WU.(1969). Purification and properties of lactaldehyde dehydrogenase from E.coli. *J.Biol.Chem.*, 244: 5233-5238.



66. SRIDHARA,S., T.T.WU, T.M.CHUSED y E.C.C.LIN.(1969). Ferrous activated nicotinamide adenine dinucleotide linked dehydrogenase from a mutant of E.coli capable of growth on 1,2-propanediol. J.Bacteriol., 98:87-95.
67. SRI VENOGUPAL,K.S. y P.R.ADIGA.(1980). Artifactual staining of proteins on poliacrylamide gels by nitrobluetetrazolium chloride and phenazine methasulphate. Anal.Biochem., 101: 215-220.
68. STANIER,R.Y., N.J.PALLERONI y M.DOUDOROFF.(1966). The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. J.Gen.Microbiol., 43:159-271.
69. STEINMAN,C.R. y W.B.JAKOBY.(1968). Yeast aldehyde dehydrogenase. II.Properties of the homogeneous enzyme preparation. J.Biol.Chem., 243:730-734.
70. TAKAGI,Y. y H.SAWADA.(1964). The metabolism of L-rhamnose in E.coli. I. L-rhamnose isomerase. Biochim.Biophys.Acta, 92:10-17.
71. TAKAGI,Y. y H.SAWADA.(1964). The metabolism of L-rhamnose in E.coli. II. L-rhamnulose kinase. Biochim.Biophys.Acta, 92:18-25.
72. TANI,Y. y W.B.DEMPSEY.(1973). Glycolaldehyde is a precursor of pyridoxal phosphate in E.coli B. J.Bacteriol.,116:341-345.
73. TING,S-M., O.N.MILLER y O.Z.SELLINGER.(1965). The metabolism of lactaldehyde. VII. The oxidation of D-lactaldehyde in rat liver. Biochim.Biophys.Acta, 97:407-415.
74. VEEGER,C. y V.MASSEY.(1960). Inhibition of lipoyl dehydrogenase by trace metals. Biochim. Biophys.Acta, 37:181-183.
75. VEEGER,C. y V.MASSEY.(1962). The reaction mechanism of lipamide dehydrogenase. II.Modification by trace metals Biochim. Biophys.Acta, 64:83-100.
76. VELLA,G.J., R.E.GIL, B.S.MORTON y I.D.SPENCER.(1980). The



status of glycolaldehyde in the biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub>.  
J.Biol.Chem., 255:3042-3048.

77. WILLETS, A. (1981). Bacterial metabolism of ethylene glycol. Biochim.Biophys.Acta, 677:194-199.
78. WONG, D.J.O. y S.J.AJL. (1956). Conversion of glyoxylate and acetate to malate. J.Amer.Chem.Soc., 78:3230-3231.
79. ZAGALAK, B., P.A.FREY, L.KARABATSOS y R.H.ABELES. (1966). The stereochemistry of the conversion of D and L-1,2-propanediol to propionaldehyde. J.Biol.Chem., 241:3028-3035.